Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart

Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

Neuraminidase-Isolierung von Influenza A-Viren und Neuraminidase-Antikörper-Bestimmung in einem enzymgebundenen Immunoassay (ELISA)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WINFRID SCHUBERT
aus Stuttgart

1983

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

Neuraminidase-Isolierung von Influenza A-Viren und Neuraminidase-Antikörper-Bestimmung in einem enzymgebundenen Immunoassay (ELISA)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WINFRID SCHUBERT
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. H. Ritter
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. J. Schmitt

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Materialien und Virusstämme	9
3.	Methoden	12
3.1	Vermehrung und Isolierung des Virus	12
3.2	Hämagglutinationstest	17
3.3	Proteinbestimmung	18
3.4	Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität	19
3.4.1	Bestimmung der NA-Aktivität mit MPN als Substrat	19
3.4.2	Bestimmung der NA-Aktivität mit Fetuin als Substrat	20
3.5.	Abspaltung der Neuraminidase von der Lipidhülle des Virus und Isolierung der Neuraminidase	22
3.5.1	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Bromelin	22
3.5.2	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Pronase	23
3.5.3	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Nagarse	23
3.5.4	Isolierung der Neuraminidase	24
3.6	Bestimmung der Proteaseaktivität	27
3.7	Kopplung der Neuraminidase an Peroxydase und Isolierung der Reaktionsprodukte	28
3.8	Bestimmung der Peroxydaseaktivität	28
3.9	Durchführung des enzymgebundenen Immunoassays	29

Abschnitt Seite

4.	Ergebnisse	32
4.1	Abspaltung der Oberflächenantigene von der Lipidhülle des Virus	32
4.1.1	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Bromelin	32
4.1.2	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Nagarse	35
4.1.3	Abspaltung der Oberflächenantigene mit Pronase	35
4.2	Auftrennung von Pronase und Neuraminidase	42
4.3	Enzymmarkierung der Neuraminidase	42
4.4	Anlagerung des Antigens an Mikrotiterplatten	43
4.5	Anwendung des ELISA und Qualitätskriterien des Testes	51
5.	Diskussion	58
5.1	Isolierung der Neuraminidase	58
5.2	Enzymmarkierung der Neuraminidase	64
5.3	Bestimmung von Anti-NA-Antikörpern	66
	Zusammenfassung	77
	Literaturverzeichnis	78
	Lebenslauf	100

Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
BSA	Albumin aus Rinderserum
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay
HA bzw. H	Hämagglutinin
MPN	2-(3'-Methoxyphenyl)-N-acetyl--neuraminsäure
NA bzw. N	Neuraminidase
NIT	Neuraminidasehemmtest
PBS	Phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNP	Ribonukleoprotein
TCA	Trichloressigsäure

1. Einleitung

Noch im 15. Jahrhundert wurde eine ungewöhnlich ansteckende, fieberhafte Krankheit der Atemwege einem Klimaumschwung zugeschrieben, der seinerseits durch eine ungünstige Sternkonstellation verursacht sein sollte (47). Es dauerte Jahrhunderte bis Pfeiffer während der großen Pandemie 1889-92 erstmals ein infektiöses Agens -den Hämophilus influenzae- als den eigentlichen Verursacher der Erkrankung zu erkennen glaubte (24). Dieser Irrtum konnte erst Jahrzehnte später aufgeklärt werden, als es Smith, Andrewes und Laidlaw gelang mit einem bakterienfreien Filtrat einer Rachenspülflüssigkeit Grippekranker, Frettchen zu infizieren (98). Grundlage für die großen Fortschritte bei der Aufklärung der Struktur des Virus und bei seiner Epidemiologie war die Entdeckung, daß das Virus in großen Mengen und in kurzer Zeit in embryonierten Hühnereiern vermehrt werden konnte und die Entwicklung einer zum Nachweis antiviraler Antikörper geeigneten Methode, dem Hämagglutinationshemmtest nach Hirst (44).
Influenza ist eine mit Allgemeinsymptomen einhergehende

Erkrankung des Respirationstraktes. Die Vermehrung der Viren in den Zellen des Oberflächenepithels führt dort zu einer entzündlichen Reaktion, zu Nekrosen und einer flächenhaften Abstoßung großer Epithelteile; Vorgänge, die die Zeichen der akuten Erkrankung bedingen (53).

Die Influenza-Viren gehören zur Gruppe der Myxoviren. Die für die Replikation wichtigen Bestandteile des Virus und weitere Proteinbestandteile sind von einer Lipidhülle umgeben. Die beiden Oberflächenantigene des Virus, das Hämagglutinin und die Neuraminidase, sind mit ihrem hydrophoben Ende in dieser Hülle verankert. Das Hämagglutinin, mit dessen Hilfe sich das Virus an sialinsäurehaltige Receptoren mancher tierischer und menschlicher Zellen anlagern kann, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75 000 - 80 000 Dalton (52). Die Neuraminidase, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55 000 - 70 000 Dalton (52), spaltet N-Acetylneuraminsäure von Hämagglutininreceptoren der Zelle ab und gestattet dem Virus so von der Zellwand zu eluieren. Die Neuraminidase hydrolysiert Polysaccharidanteile von Mucoproteinen und verhindert damit, daß diese Substanzen ein Vordringen des Virus bis zu den Epithelien blockieren (38). Die Neuraminidase spielt weiter bei der Freisetzung

des Virus von infizierten Zellen eine Rolle (21,93). Das aktive Enzym besteht aus 4 Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (59). Unterhalb der Lipidhülle des Virus liegt das M-Protein (Molekulargewicht 21 000- 27 000 Dalton), dessen Funktion noch wenig aufgeklärt ist (52). In enger Beziehung zur viralen RNA steht das Ribonukleoprotein (Molekulargewicht 53 000- 60 000 Dalton) (52), dessen unterschiedlicher antigener Charakter es ermöglicht, die Influenza-Viren in 3 Typen (A,B,C) zu unterteilen. Das Genom des Virus besteht aus einsträngiger, segmentierter RNA. Jedes der acht RNA-Segmente codiert für mindestens ein Virusprotein. Die starke Segmentierung der Influenza-RNA macht es möglich, daß während einer Infektion mit unterschiedlichen Stämmen in hoher Frequenz Rekombinanten gebildet werden, vielleicht eine wichtige Voraussetzung für die Bildung neuer Stämme. Die isolierten Influenza-RNA--Segmente sind nicht infektiös. Nur mit einer viruseigenen Polymerase (Molekulargewicht 81 000- 94 000 Dalton) (52) können intrazellulär komplementäre RNA-Stränge gebildet werden, die wahrscheinlich als m-RNA die Synthese des jeweiligen viralen Proteins steuert. Wenn -aus bisher noch hypothetischen Gründen- sich eines oder beide der Oberflächenantigene so

ändern, daß sie nicht mehr mit Antikörpern gegen das N- oder H-Antigen der bisher vorherrschenden Stämme kreuzreagieren, wenn also durch Antigen-Shift ein neuer Influenza-Subtyp entstanden ist, trifft das Virus auf eine Situation, die sich dadurch auszeichnet, daß praktisch in keiner Bevölkerungsgruppe ein ausreichender Antikörper-Schutz besteht. Das Virus breitet sich weltweit aus, es kann zur Pandemie kommen (47,53). Als Folge von Mutation und Selektion entstehen laufend Virusstämme, die sich nur gering von dem ursprünglichen, die Pandemie auslösenden Virus unterscheiden. Gegen diese durch Antigen-Drift entstandenen Virusstämme besteht kein vollwertiger Antikörperschutz in der Bevölkerung, weswegen diese Stämme epidemische (interpandemische) Krankheitswellen auslösen können (53,92). Im Verlauf solcher Pandemien oder Epidemien kommt es zu einem Anstieg der Morbidität und damit zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten (100,101). Von der für solche Krankheitswellen charakteristischen Übersterblichkeit sind vor allem ältere Menschen, Kinder und Patienten mit einer kardialen oder pulmonalen Insuffizienz betroffen. Während man sich gegen eine Infektion mit einem neuen Subtyp durch eine Impfung zunächst nicht schützen kann, kann eine Grippeerkrankung während einer interpandemischen

Grippewelle durch rechtzeitige Verabreichung einer Influenza-Vaccine in ihrem Verlauf abgeschwächt oder gemildert werden. Es besteht die Möglichkeit, mit einem speziellen Impfstoff die Bildung von nur gegen die Neuraminidase gerichteten Antikörpern zu induzieren (46,54), wodurch eine Infektion mit Influenza-Viren in ihrem Verlauf abgeschwächt werden kann (10,49,81,93). Es wurde postuliert, daß der nach einer solchen subklinischen Infektion entstehende Antikörperschutz länger anhalten würde. Diese Annahme konnte bisher nicht bestätigt werden (23,103).

Influenza-Viren enthalten als typenspezifische Antigene das Ribonukleoprotein und das Matrix-Protein. Mit Hilfe dieser Antigene gelingt es die Influenza--Viren in 3 verschiedene Typen einzuteilen, die jeweils im Hinblick auf den antigenen Charakter des Inneren oder Capsidantigens (weitgehend identisch mit dem RNP) sehr ähnlich sind (75). Die Typen A und B kann man auf Grund des antigenisch unterschiedlichen Charakters der Oberflächenantigene und auf Grund des unterschiedlichen Wirtsbereichs weiter in Subtypen unterteilen. Typspezifische Antikörper, d.h. Antikörper gegen das Capsidantigen, schützen nicht vor einer Reinfektion mit demselben Typ. Antikörper, die gegen das Hämagglutinin gerichtet sind, bedingen, solange sie in ausreichender

Menge vorhanden sind, eine vollständige Immunität. Antikörper gegen die Neuraminidase hemmen die Freisetzung des Virus aus der Zelle. Sie können eine Infektion nicht verhindern (118). Der Verlauf und die Schwere einer Erkrankung können durch spezifische Antikörper gegen Neuraminidase jedoch beeinflußt werden (118).

Die bis heute am meisten verwendete und von der WHO empfohlene Methode zur Bestimmung von Anti-NA-Antikörpern ist der Neuraminidasehemmtest von Aymard-Henry (4), eine sehr spezifische, sehr empfindliche Bestimmungsmethode, die allerdings zeit- und materialaufwendig und deswegen für größere Screening-Untersuchungen ungeeignet ist. Zur Bestimmung von Antikörpern gegen die Neuraminidase wurden weiter Immundiffusionsteste, ein RIA und ein neuraminidasespezifischer Hämagglutinationshemmtest vorgeschlagen (101).

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, eine Methode zur Bestimmung von Antikörpern gegen Neuraminidase zu verwenden, die weniger zeit- und materialaufwendig, methodisch einfacher und kostengünstiger als die vorhandenen Tests ist. Diese Bedingungen schien der enzymgebundene Immunoassay (ELISA) zu erfüllen. Der ELISA wurde 1971 von VAN WEEMEN und gleichzeitig von E.ENGVALL

entwickelt (34,106). Der ELISA kann als Fortentwicklung des RIA (117) angesehen werden. Er benötigt jedoch im Unterschied zum RIA keine teuren Geräte. Die einmal markierten Antikörper oder Antigene sind über Monate, eventuell über Jahre stabil. Es werden keine radioaktiven Isotope verwendet, so daß auch die besonderen Sicherheitsvorkehrungen, die beim Umgang mit radioaktiven Substanzen unumgänglich werden, entfallen. Die Sensitivität der Einzelbestimmung liegt im fmol bis pmol-Bereich (42,71,73,90,110,111). Der enzymgebundene Immunoassay ist damit nahezu ebenso empfindlich wie der Radioimmunoassay. Die Spezifität des Assays hängt von der Reinheit der Antigenpräparation und dem Spezifitätsprofil des Antiserums ab, was bei einem Radioimmunoassay nicht anders ist. Der ELISA ist eine Methode, mit der man in kurzer Zeit -halbautomatisiert- große Serumkollektive testen kann.

Um spezifisch gegen die Neuraminidase gerichtete Antikörper nachzuweisen, schien es erforderlich Neuraminidase und Hämagglutinin zu trennen. Eine Auftrennung der Oberflächenantigene wird erst möglich, wenn die die beiden Oberflächenantigene verbindende Lipidmembran aufgelöst oder die beiden Antigene von der Membran abgetrennt werden (17).

Die dafür notwendige chemische oder enzymatische Manipultaion an den Oberflächenantigenen führt häufig zur Zerstörung der Antigene (10,20,19,39,40 48,50,61,64,65,66,92,112). Vor der Durchführung des ELISA war es deswegen notwendig ein Verfahren zu suchen, mit dem auch empfindliche Oberflächenantigene ohne großen Aufwand abgetrennt werden konnten.

2. Materialien und Virusstämme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Materialien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

AP markiertes anti-IgG	Behringwerke, Marburg
4-Aminoantipyrin	Serva, Heidelberg
4-Aminoantipyrinlsg.	1,3 mM 4-Aminoantipyrin in Tris-HCl-Puffer pH 8,5 mit 1,33 Volumenprozent Äthanol
5-Aminosalicylsäure	EGA-Chemie, Steinheim
Amphotericin B	von Heyden, München
Bradford-Reagenz	100mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50ml Äthanol (95%) lösen, 100ml Orthophospor-säure zusetzen und mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen
Braunosan	B.Braun, Melsungen
Bromelin	Serva, Heidelberg
BSA	Behringwerke, Marburg
Butanol-HCl	n-Butanol mit 5% konz.HCl
Coomassie Brilliant Blue G250 = Serva Blau G reinst	Serva, Heidelberg
Fetuin	Calbiochem. La Jolla Calif. USA

Fetuinlsg.	48mg Fetuin in 1ml Aqua bidest. lösen und 1ml Phosphatpuffer pH 5,9 mit 6mM $CaCl_2$ zufügen
Glutaraldehyd reinst	Serva, Heidelberg
Glycin	EGA-Chemie, Steinheim
Kaliumhexacyanoferratlsg.	197mg Kaliumhexacyanoferrat in 100ml Aqua bidest. gelöst
MPN-Lösung	15ug MPN in 100ul 0,1m Phosphatpuffer pH 5,9 gelöst
Nagarse	Serva, Heidelberg
Natriumarsenitlsg.	10g $NaAsO_2$ und 7,1g Na_2SO_4 in 100ml Aqua bidest. gelöst und 0,3ml H_2SO_4 zugesetzt
Natriumperjodatlsg.	4,28g $NaJO_4$ in 38ml Aqua bidest. gelöst und 62ml Orthophosphorsäure zugesetzt
Penicillin G	Hoechst AG, Frankfurt
Peroxydase aus Meerrettich (ca. 400 U/min)	Serva, Heidelberg
Polystyrol-Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Pronase	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Hoechst AG, Frankfurt
TCA	EGA-Chemie, Steinheim
Thiobarbitursäurelsg.	1,2g Thiobarbitursäure 14,2g Na_2SO_4 in 200ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung

	muß vor jedem Versuchsansatz neu hergestellt werden.
Tris	EGA-Chemie, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg

Virusstämme:

A/Brazil/11/78 (H1N1) wurde uns vom Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes überlassen.

Die Rekombinanten Heq-1/N2 A/Texas/77 und Heq-1/N1 A/USSR/77 wurden vom National Biological Standard Board London zur Verfügung gestellt.

3.Methoden

3.1. Vermehrung und Isolierung des Virus (14,60)

Zur Vermehrung des Virus wurden 11 Tage alte embryonierte Hühnereier verwendet. Nach 10-11 tägiger Inkubation bei 37°C in einem Brutschrank wurden die Eier durchleuchtet, die unbefruchteten und diejenigen mit abgestorbenen Embryonen verworfen. An den verbliebenen Eieren wurde die Grenze zwischen Chorionallantoishöhle und Luftsack angezeichnet und die Position des Embryo markiert. Die Oberfläche des Eies wurde mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel (Polyvidon-Jod bzw. Braunosan^{R}) desinfiziert. Mit Hilfe einer Dentalnadel wurde die Schale an der markierten Stelle durchbohrt und es wurden 0,2ml einer Suspension eines bestimmten Influenzastammes in einer Verdünnung von 10^{-3} - 10^{-4} infektiösen Allantoisflüssigkeit (HA-Titer 1:512 oder höher) in die Chorionallantoishöhle inokuliert. Zur Vermeidung einer Superinfektion wurde der Virussuspension Penicillin, Streptomycin und Amphotericin zugegeben. Die Eier wurden 2 Tage bei 33°C inkubiert und anschließend für 24h bei 4-8°C aufbewahrt. Während dieser Zeit starben die Embryonen ab und die Blutgefäße kontrahierten sich, so daß es

beim Absaugen der Allantoisflüssigkeit nicht zu einem Bersten der Gefäße und einer nachfolgenden Verunreinigung der Chorioallantoisflüssigkeit mit Erythrocyten kommen konnte, was zu einer Ertragsminderung geführt hätte. Nach gründlicher Desinfektion der Eischale mit komplexgebundenem Jod (Braunosan) und 70% igem Alkohol wurde das Ei mit einer sterilen Schere an der Grenze zwischen Allantoishöhle und Luftsack, knapp oberhalb der Allantoismembran, vorsichtig eröffnet. Die Allantoishöhle wurde anschließend mit 2 sterilen Pinzetten freipräpariert, und die Allantoisflüssigkeit mit Hilfe einer 10ml Pipette und eines Peleusballes abgesaugt. Pro Ei konnten 6-10ml Allantoisflüssigkeit gewonnen werden. Durch bakterielle Superinfektion oder Perforation des Dottersackes trübe Allantoisflüssigkeit wurde verworfen. Klare Allantoisflüssigkeit wurde in einem in Eiswasser stehenden Glasgefäß gesammelt. Um gröbere Verunreinigungen abzutrennen, wurde die abgesaugte Flüssigkeit niedertourig in einer Stock-Zentrifuge (Stufe VI, 30min) zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde dekantiert und durch mehrere Lagen Verbandskompressen filtriert, um flottierendes Material abzutrennen. Nun wurde das Virus in einem Beckman-Winkelrotor

Typ 21 oder Typ 30 bei 20 000 rpm bzw. 28 000 rpm 1h (= 53 700g bei $r_{max.}$ bzw. 92 000g bei $r_{max.}$) pelletiert. Das Virus-Pellet, das eine strohgelbe Farbe hatte, wurde in PBS, dem 0,08% Azid zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugesetzt waren, resuspendiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde die Virus-Suspension bei -78°C tiefgefroren. Das ursprüngliche Volumen der Virus-Suspension wurde dabei auf 1/10 des Anfangsvolumens vermindert. Vor der weiteren Reinigung wurde die tiefgefrorene Virus-Suspension in einem 37°C warmem Wasserbad aufgetaut. Die aggregierten Viren wurden durch mehrmaliges Ansaugen und Ausspritzen durch eine Kanüle Nr. 12 resuspendiert. Die Resuspension der Viren erfolgte in einem durch Eiswasser gekühlten kleinen Erlenmeyerkolben. Die noch durch Bakterien, Membranteile und Zelltrümmer verunreinigte Suspension wurde, um aggregiertes Material abzutrennen, niedertourig zentrifugiert.(Stock-Zentrifuge Stufe VI= 2000g). Der Überstand, der stark opaleszierte, wurde vorsichtig dekantiert und dann über einen Saccharose-Stufengradienten (50% und 30% Saccharose in PBS mit jeweils 0,08% Natriumazid) geschichtet. Während eines einstündigen Zentrifugenlaufes bei 25 000 rpm in einem Beckman-Schwingrotor (SW 27) (= 113 000g bei $r_{max.}$)

sammelte sich das Virus zwischen der 30% igen und der 50% igen Saccharose. Der Stufengradient wurde von oben nach unten abgesaugt, die erhaltenen Fraktionen mit Hilfe des Hämagglutinationstestes auf ihren Gehalt an Viren untersucht (Abb.1). Die virushaltigen Fraktionen wurden gesammelt und 1:2 mit PBS, das Natriumazid in einer Konzentration von 0,08% enthielt, verdünnt. Während eines einstündigen Zentrifugenlaufes bei 28 000 rpm (= 92 000g bei $r_{max.}$) in einem Beckman-Winkelrotor Typ 30 wurde das Virus erneut pelletiert. Das virushaltige Pellet wurde mit Hilfe einer 10ml Spritze (Kanüle Nr.12) resuspendiert und 30min. bei Stufe VI in der Stock-Zentrifuge zentrifugiert. Der virushaltige Überstand dieses Zentrifugenlaufes wurde schließlich über einen linearen Saccharosegradienten (10-45% Saccharose in PBS-0,08% Natriumazid) geschichtet und 40min. bei 15 000 rpm (= 40 000g bei $r_{max.}$) in einem Beckman-Schwingrotor (SW 40) zentrifugiert. Der Gradient wurde nun in 1ml Fraktionen von oben nach unten abgesaugt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe des Hämagglutinationstestes auf ihren Virusgehalt untersucht (Abb.2). Die Fraktionen, die Viren mit einem HA-Titer von über 1:16 000 HA-Einheiten enthielten, wurden gesammelt

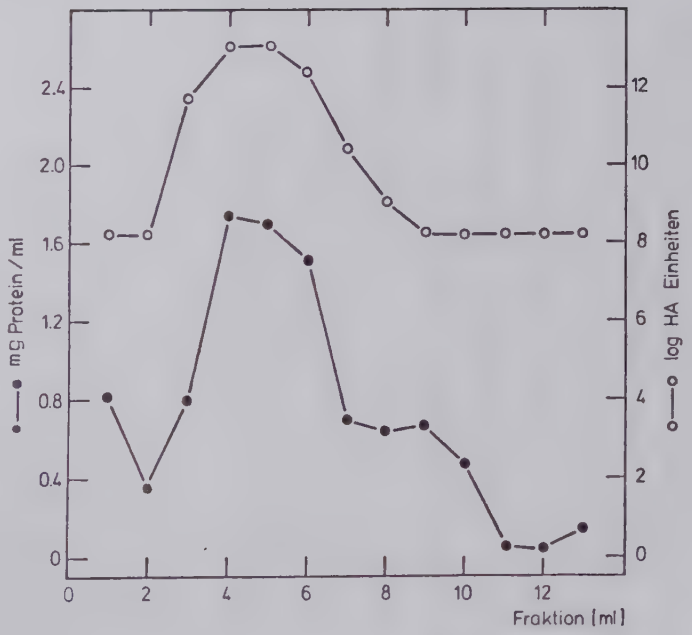


Abb.1 : Saccharose-Stufengradient zur Virusreinigung. Verteilung des Virus im Gradient.

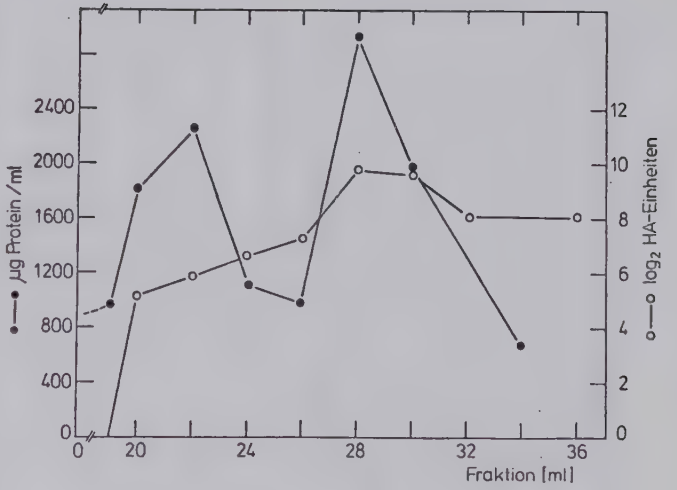


Abb.2 : Saccharose-Lineargradient zur Virusreinigung. Verteilung des Virus im Gradient.

und in einem einstündigen Zentrifugenlauf bei 30 000rpm (=160 000g bei $r_{max.}$) in einem Beckman-Schwingrotor (SW 40) repelletiert. Das Virus wurde in 1/1000 des ursprünglichen Volumens der Allantoisflüssigkeit aufgenommen und durch niedertourige Zentrifugation von aggregiertem Material befreit. Der Proteingehalt der erhaltenen Virussuspensionen lag zwischen 7 und 11mg/ml, der HA-Titer bei über $8x10^6$ HA-Einheiten. Die gereinigten Viren wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Aufarbeitung bei -78^oC tiefgefroren.

3.2 Hämagglutinationstest (44)

Mit Hilfe des Hämagglutinins können sich Influenza-Viren an Erythrocyten anlagern und diese zur Agglutination bringen. Indem man feststellt, bis zu welcher Verdünnung einer bestimmten Virusmenge eine gegebene, konstante Menge Erythrocyten zur Agglutination gebracht wird, kann man Rückschlüsse auf die in der Probe vorhandene Virusmenge ziehen. Die Methode eignet sich nicht zur Bestimmung von abgespaltenem Hämagglutinin. In einer Mikrotestplatte wird eine geometrische Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe hergestellt. Zu jeder Verdünnung gibt man 50ul einer 0,5%igen Suspension von Hühnererythrocyten in PBS, wartet

1h und liest die Verdünnung ab, in der gerade keine Agglutination mehr erfolgte (91).

3.3 Proteinbestimmung (15).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Proteinbestimmungen nach der von BRADFORD (15) vorgeschlagenen Methode durchgeführt. Die Methode nach BRADFORD wurde der LOWRY-Methode (70), die seit fast 30 Jahren zur Mikrobestimmung von Proteinen verwendet wird, vorgezogen, weil sie weniger zeitaufwendig ist, weniger Pipettierschritte erfordert, durch weniger Substanzen gestört wird und etwas empfindlicher ist als die Methode nach LOWRY. Das Prinzip der Methode von BRADFORD beruht darauf, daß der Textilfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 bei seiner Bindung an Proteine einer Farbänderung von rot nach blau unterliegt. Der entstehende Protein-Farbstoffkomplex hat einen hohen Extinktionskoeffizienten; deshalb eignet sich diese Methode zur Bestimmung von Mikrogrammengen Protein.

Ansatz

	Probe	Leerwert
Puffer	-	0,1 ml
Proteinlösung	0,1 ml	-

	Probe	Leerwert
Bradford-Reagens	2 ml	2 ml

Den Ansatz 10 Minuten stehenlassen und dann innerhalb einer Stunde die Extinktion gegen den Leerwert messen.

3.4 Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität.

3.4.1 Bestimmung der Neuraminidaseaktivität mit MPN als Substrat (79,88).

Die Neuraminidase (Mucopolysaccharid N-Acetylneuraminyl-Hydrolase, EC 3.2.1.18) hydrolysiert die Alpha-Glykosidbindung zwischen dem C2 eines N-Acetylneuraminsäuremoleküls und dem C3 eines Methoxyphenolmoleküls.
Das entstehende 3-Methoxyphenol bildet in Gegenwart oxidierender Agentien mit 4-Aminoantipyrin ein gefärbtes Chinon, dessen Adsorption bei 500nm bestimmt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode überwiegend zur Bestimmung der Neuraminidaseaktivität verwendet, weil der Nachweis des Aglykons 3-Methoxyphenol weder durch andere Ketozucker noch durch große Proteinmengen gestört wird. Diese Methode hat gegenüber der etablierten Methode nach WARREN und AMINOFF (109,1), die durch Ketozucker gestört wird, den zusätzlichen Vorteil, daß sie weniger zeitaufwendig ist.

Ansatz

	Probe	Leerwert	Standard
0,1m Phosphat-puffer pH 5,9	-	0,1ml	-
Enzymlösung	0,1ml	-	-
Methoxyphenol	-	-	5-50uMol in 0,1ml Puffer
MPN-Lösung	0,1ml	0,1ml	0,1ml
30 Minuten inkubieren			
4-Aminoantipyrinlsg.	0,15ml	0,15ml	0,15ml
K-Hexacyanoferratlsg.	0,05ml	0,05ml	0,05ml

Die Adsorption des entstehenden Chinons wird bei 500nm gegen den Leerwert gemessen. Die Aktivität der Neuraminidase wird in mU angegeben. 1mU ist definiert als die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen während einer Minute 1nMol N-Acetylneuraminsäure bzw. 1nMol 3-Methoxyphenol freisetzt.

3.4.2 Bestimmung der Neuraminidaseaktivität mit Fetuin als Substrat (1,4,80,109).

Zu Beginn der Arbeit wurde die Neuraminidaseaktivität mit Fetuin als Substrat, nach der von WARREN und AMINOFF beschriebenen und von AYMARD-HENRY et al. zusammengefaßten Methode, bestimmt. Bei dieser Methode

wird aus Fetuin N-Acetylneuraminsäure abgespalten. Die N-Acetylneuraminsäure wird durch Periodat zu Beta-Formylpyruvat oxidiert. Diese Verbindung reagiert mit 2-Thiobarbitursäure zu einem roten Farbstoff, dessen Adsorptionsmaximum bei 549nm liegt.

Ansatz

	Probe	Leerwert
NA- oder Virusverd.	0,05 ml	-
Fetuinlsg.	0,15 ml	0,15 ml
18 Stunden bei 37°C inkubieren, dann auf 20°C abkühlen.		
Natriumperiodatlsg.	0,1 ml	0,1 ml
20 Minuten bei 20°C stehenlassen.		
Arsenit-Reagens	1,0 ml	1,0 ml
Thiobarbitursäurelsg.	2,5 ml	2,5 ml
25 Minuten in kochendes Wasser stellen, dann abkühlen.		
Butanol-HCl	4,0 ml	4,0 ml

Gut schütteln, zentrifugieren, Butanol-Fraktion absaugen und die Absorption bei 549nm bestimmen.

3.5 Abspaltung der Neuraminidase von der Lipidhülle des Virus und Isolierung der Neuraminidase.

3.5.1 Abspaltung der Oberflächenantigene mit Bromelin (7,16,22,85,102).

Bromelin ist eine aus Ananas -Familie Bromeliaceae- isolierte Protease (EC 3.4.22.5), die nach BACHMAYR et al. in der Lage ist die Oberflächenantigene des Influenza--Virus von der Lipidhülle abzutrennen, ohne daß die freigesetzten Glykoproteine in Abwesenheit von Detergentien aggregieren würden. Das grob gereinigte und pelletierte Virus wird in Tris-HCl-Puffer (pH 7,2; 0,1m), der 2mg/ml Bromelin, 0,05m 2-Mercapto--äthanol und 0,001m EDTA enthielt, aufgenommen, in einem Zentrifugenlauf bei Stufe VI (=2000g) einer Stock-Zentrifuge von aggregiertem Material befreit und in verschiedenen Ansätzen bei 37°C und bei 8°C inkubiert. Nach 1h, 2h, 3h, 6h und 12h wurden Proben entnommen und auf ihre Neuraminidaseaktivität hin untersucht. Zu Beginn der Inkubation und am Ende der Inkubation wurden Proben zur Bestimmung des HA-Titers entnommen. Es sollte geklärt werden, inwiefern es durch die Behandlung des Virus mit Bromelin zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität der Neuraminidase kommt.

3.5.2 Abspaltung der Oberflächenantigene mit Pronase (8,19,61,96,115,77)

Pronase ist eine aus Kulturen von Streptomyceus griseus K-1 gewonnene Mischung verschiedener Proteasen. Das grob gereinigte und pelletierte Virus wurde in PBS, das Penicillin, Amphotericin und Streptomycin enthielt, aufgenommen und in verschiedenen Ansätzen bei 37°C und bei 8°C mit Pronase inkubiert. Nach 1h, 2h, 3h, 6h und 12h wurden Proben entnommen und auf ihre NA-Aktivität hin untersucht. Zu Beginn und am Ende der Inkubation wurden Proben zur Bestimmung des HA-Titers entnommen. Zur Abspaltung und anschließenden Isolierung der Neuraminidase aus gereinigten Virus-Präparationen wurde eine Suspension von etwa 7mg Virus mit 5mg Pronase versetzt und 28h bei 8°C inkubiert.

3.5.3 Abspaltung der Oberflächenantigene mit Nagarse (40,48,50,78).

Nagarse ist eine Serin-Protease, die aus Kulturen von Bacillus subtilis isoliert wird und auch unter dem Namen Subtilisin BPN bekannt ist (EC 3.4.4.16). Die Subtilisine hydrolysieren sowohl Peptidbindungen als auch Esterbindungen.
Das grob gereinigte und pellitierte Virus wurde in Tris-HCl-Puffer (pH 8,6;0,1m), der 2mg/ml Nagarse

und Penicillin, Streptomycin und Amphotericin enthielt, aufgenommen und in verschiedenen Ansätzen bei 37°C und 8°C inkubiert. Nach 1h, 2h, 3h, 6h und 12h wurden Proben entnommen und auf ihre NA-Aktivität hin untersucht. Zu Beginn und am Ende der Inkubation wurden Proben zur Bestimmung des HA-Titers entnommen.

3.5.4 Isolierung der Neuraminidase.

Die mit Pronase behandelte Virussuspension wurde zur Abtrennung der Oberflächenantigene (HA und NA) von den inneren Antigenen des Virus vorsichtig auf einen Saccharose-Lineargradienten (10-50% Saccharose in PBS mit 0,08% Natriumazid) geschichtet. Während eines einstündigen Zentrifugenlaufes bei 30 000 rpm (=170 000g bei $r_{max.}$) drangen die abgespaltenen Oberflächenantigene und die Protease kaum in den Gradienten ein und konnten in den oberen Fraktionen des Gradienten nachgewiesen werden (Abb.3).
Zur Auftrennung von Protease und Neuraminidase wurden die beiden neuraminidasehaltigen Fraktionen vorsichtig auf einen Lineargradieten geschichtet (5-20% Saccharose in PBS mit 0,08% Natriumazid) und in einem Beckman-Schwingrotor (SW 40) einem Zentrifugenlauf von 20h bei 35000 rpm (=217 000g bei $r_{max.}$) und bei 4°C unterworfen (Abb.4).

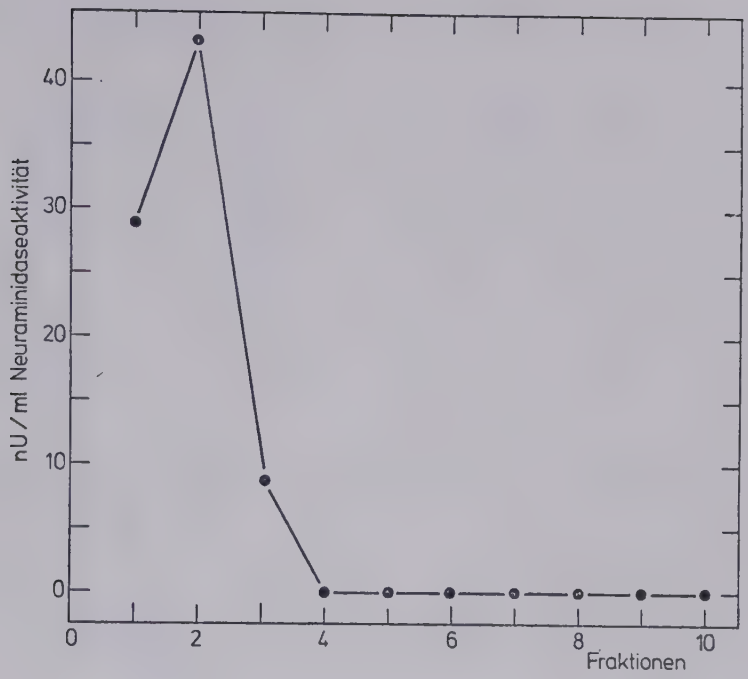


Abb.3 : Saccharose-Lineargradient zur Auftrennung von Neuraminidase und Core-Antigen. Verteilung der Neuraminidase im Gradient. Das Core-Antigen findet man zwischen Fraktion 6 und 8, in diesem Bereich ist keine Neuraminidaseaktivität mehr nachweisbar.

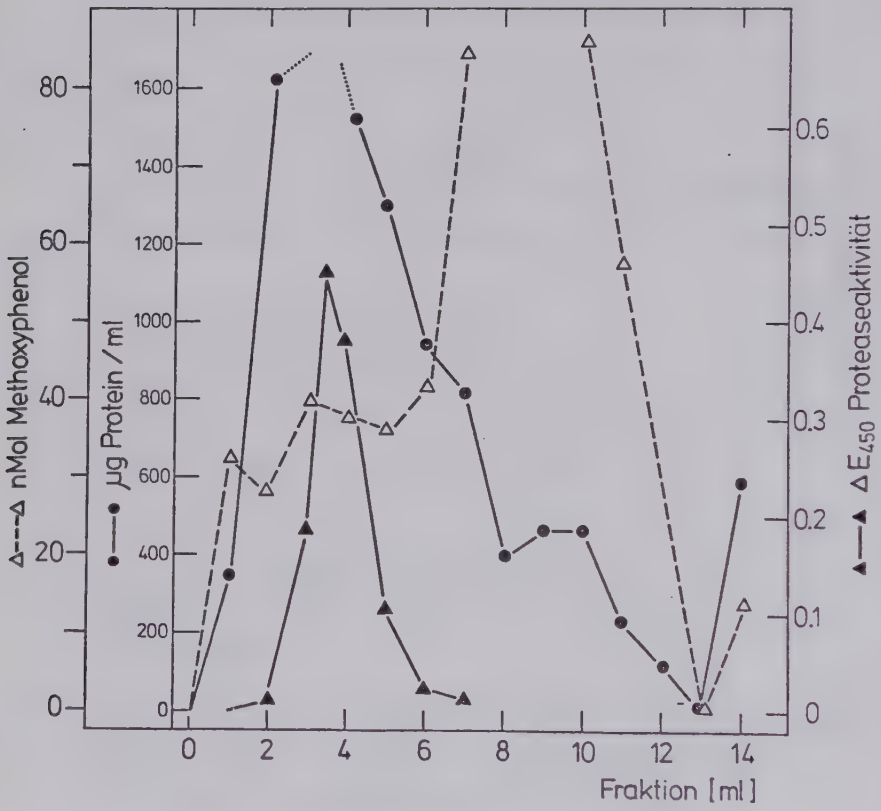


Abb.4 : Saccharose-Lineargradient zur Auftrennung von Neuraminidase und Pronase. Die Aktivität der Neuraminidase ist proportional der Menge der freigesetzten Methoxyphenolmoleküle.

3.6 Bestimmung der Proteaseaktivität (77).

Die aus einem geeigneten Substrat (2% Casein in PBS) freigesetzte Tyrosinmenge wird, nach Inaktivierung und Abtrennung der nicht proteolysierten Proteine, photometrisch bei 275nm gegen Wasser als Leerwert gemessen. Die Aktivität der Protease ist proportional der Extinktionsdifferenz.

Ansatz

	Probe	Leerwert
2% Casein	2ml	-
PBS	-	2ml
10 Minuten bei 40°C inkubieren.		
TCA	4ml	4ml

Ansatz schütteln, 20 Minuten bei 40°C inkubieren, ausgefällte Proteine durch Filtration abtrennen und anschließend die Extinktionsdifferenz gegen Wasser als Leerwert messen.

3.7 Kopplung der Neuraminidase an Peroxydase (2,3,51,76, 83,86) und Isolierung der Reaktionsprodukte.

Zu der in 1ml PBS gelösten, proteasenfreien NA (ca. 400ug) wurde 1ml einer Lösung von 2% Glutaraldehyd, 0,1% Lysin und 5mg Meerrettichperoxydase in PBS gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei 22°C inkubiert und anschließend, zur Auftrennung der Kopplungsprodukte, auf einen Saccharose-Lineargradienten (10-50% Saccharose in PBS mit 0,08% Natriumazid) geschichtet, der bei 4°C in einem SW 40 Schwingrotor (Beckman) einem Zentrifugenlauf von 20h bei 35 000 rpm (= 217 000g bei $r_{max.}$) unterworfen wurde. Einzelne 1ml Fraktionen des Gradienten wurden von oben nach unten abgesaugt, gesammelt und auf ihren Proteingehalt,ihre Neuraminidaseaktivität, sowie auf ihre Peroxydaseaktivität hin untersucht.

3.8 Bestimmung der Peroxydaseaktivität (13,105)

Die Peroxydase (EC 1.11.1.7) katalysiert die Oxydation zahlreicher organischer Verbindungen durch Wasserstoffperoxyd. Beim Nachweis der Peroxydaseaktivität diente Wasserstoffperoxyd als Substrat und 5-Aminosalicylsäure als Wasserstoffdonator. 80mg 5-Aminosalicylsäure wurden in 100ml eines 0,02m Phosphatpuffers (pH 7,2) gelöst.Dieser Lösung wurden 10ul

30%igen Wasserstoffperoxyds zugefügt. Um eine Zersetzung des Peroxyds durch Schwermetallionen auszuschließen, wurde der Puffer mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Ein Milliliter Substratlösung wurde mit einem Milliliter Enzymlösung einer geeigneten Verdünnung vermischt und 1h bei 22°C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 450nm bestimmt. Die Substratlösung wurde jeweils vor Gebrauch frisch hergestellt.

3.9 Durchführung des enzymgebundenen Immunoassays.

Zur Antigenfixierung an der Wand einer Microtiterplatte wurde zunächst eine Antigenstammlösung mit einer Antigenkonzentration von etwa 5ug/ml hergestellt. Von dieser Stammlösung wurden dann auf einer Hälfte einer Microtiterplatte in jedes Näpfchen 25ul der Lösung titriert; die 2.Hälfte der Microtiterplatte blieb ohne Antigen. Die Platten wurden nun 24h bei 4-8°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das Antigen passiv an die Wand der Microtiterplatten adsorbiert. Danach wurde die Antigenlösung in den Platten verworfen, die Platten mit PBS gespült und anschließend in jedes Näpfchen der Microtiterplatten 200ul einer Lösung von 5%igem Rinderalbumin/2%igem Natriumazid pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde die

die Wand absättigende Albuminlösung verworfen und die Polystyrolplatten 3 mal mit PBS gespült. In die ersten 6 (antigenhaltigen) Näpfchen der Platte wurden unterschiedliche Verdünnungen eines zu untersuchenden Serums pipetiert. Zum Nachweis einer unspezifischen Adsorption wurden dieselben Serumverdünnungen auch in die antigenfreien Näpfchen titriert. Im Anschluß an eine dreistündige Inkubation der Platten bei 37°C wurden die Platten 5 mal mit PBS, dem 0,5% Tween 20 zugesetzt waren, gespült. Nach Zugabe von 50 ul mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-IgGs pro Näpfchen wurden die Platten 5 mal mit PBS-Tween 20 gespült und anschließend eine bestimmte Zeit (i.a. exakt 30 min.) mit dem Substrat -4-Nitrophenylphosphat in Glycin-HCl-Puffer pH 9,8 mit 1mM Magnesiumchlorid- inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde danach durch Zugabe von je 25ul 2m NaOH pro Näpfchen inaktiviert. Anschließend wurde die Extinktionsdifferenz -entweder direkt in einem Microelisa-Photometer (Flow-Laboratories) oder nach Verdünnung mit 500ul Wasser in einem Beckman-Photometer- gegen Wasser als Leerwert bestimmt. Die umgesetzte Substratmenge wurde jeweils an einer Eichkurve abgelesen und in Enzymeinheiten umgerechnet. Die Enzymaktivitäten wurden gegen den ln des Kehrwertes der Verdünnung aufgetragen. Der Schnittpunkt

der resultierenden Geraden mit der x-Achse ist der Titer des untersuchten Serums.

4. Ergebnisse

4.1 Abspaltung der Oberflächenantigene (HA und NA) von der Lipidhülle des Virus (27,113).

4.1.1 Abtrennung der Oberflächenantigene mit Bromelin.

Bromelin wurde wiederholt zur Abtrennung der Oberflächenantigene des Influenza-Virus eingesetzt. BRAND und SKEHEL (16) berichten über eine Abtrennung des HA von der Lipidhülle des Virus und gleichzeitiger vollständiger Zerstörung der Neuraminidase während der Bromelin-Behandlung. BACHMAYER und DESSELBERGER (7,25) fanden, daß eine Abspaltung der Neuraminidase mit Bromelin unter reduzierenden Bedingungen gelingt. Überraschenderweise führte das von BACHMAYER beschriebene Verfahren bei 37°C zu einer vollständigen Inaktivierung der NA (Abb.5). Erst durch eine Veränderung der Reaktionsbedingungen -Absenken der Temperatur auf 8°C und Verlängerung der Inkubation auf 24h- gelang es, die intakte Neuraminidase (N2) abzutrennen (Abb.5). Die N1 wurde auch unter diesen milderen Reaktionsbedingungen in kurzer Zeit vollständig zerstört (Abb.6). Das Hämagglutinin wurde bei den veränderten Reaktionsbedingungen nicht oder nur zu einem kleinen Teil von der Lipidhülle abgetrennt. Es kam zu keiner Veränderung des HA-Titers (Heq-1/N2) bzw. jediglich zu einem Absinken des Titers um 2 Stufen (Heq-1/N2). Eine Zerstörung oder

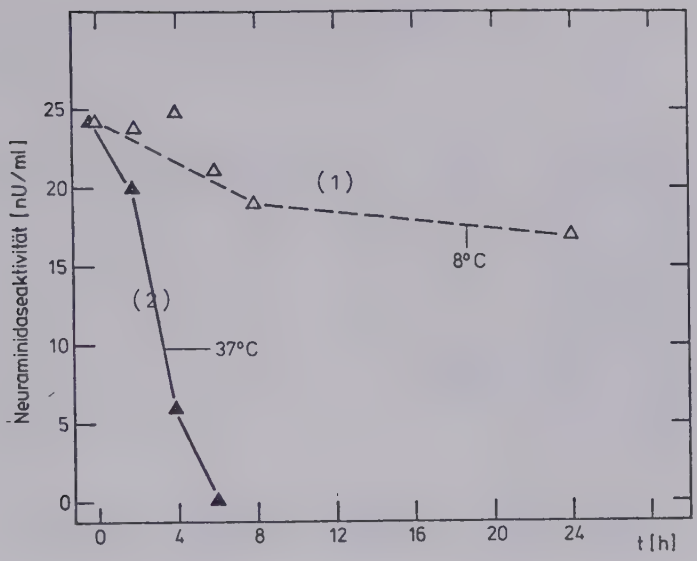


Abb.5 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Bromelinbehandlung von Influenza A/Tex/77 (Heq-1/N2) bei 8°C und 37°C.

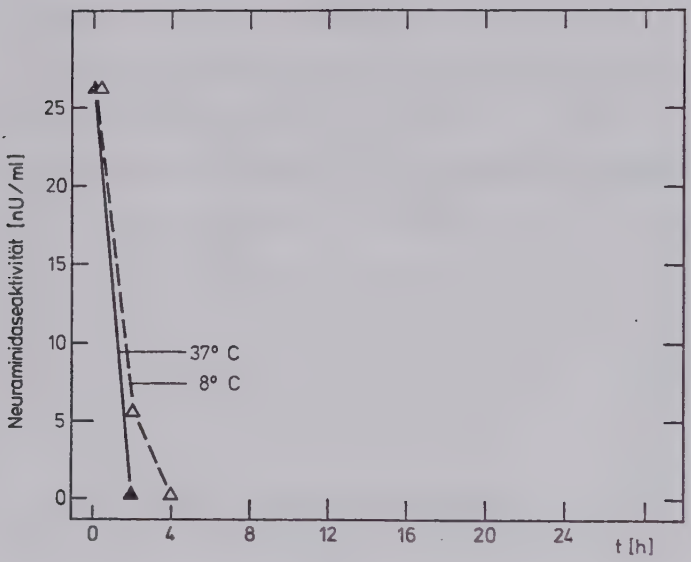


Abb.6 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Bromelinbehandlung von Influenza A/USSR/77 (Heq-1/N1) bei 8°C und 37°C.

Abtrennung des Hämagglutinins hätte den Verlust der hämagglutinierenden Aktivität zur Folge gehabt.

4.1.2 Abtrennung der Oberflächenantigene mit Nagarse.

KENDAL und GROOME (40,50) berichten über eine Abtrennung der Influenza-Neuraminidase von der Lipidhülle des Virus bei gleichzeitiger Zerstörung des Hämagglutinins. Eine Abtrennung der NA bei den angegebenen Reaktionsbedingungen gelang nicht. Im Gegenteil, die Nagarse-Behandlung des Virus führte binnen kurzem zu einer Zerstörung der NA-Aktivität. Auch in diesem Fall konnte nach Veränderung der Reaktionsbedingungen -verlängerte Inkubation bei 8°C- im Falle der N2 die Neuraminidaseaktivität erhalten werden (Abb.7). Wie schon bei der Bromelin-Behandlung des Virus führten diese Reaktionsbedingungen im Falle der N1 zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität. Die HA-Aktivität veränderte sich jeweils um 1-2 Titerstufen (Abb.8).

4.1.3 Abtrennung der Oberflächenantigene mit Pronase.

Pronase wurde wiederholt zur Abtrennung der Neuraminidase eingesetzt (8,19,61,96,115). LAVER und WRIGHT (61,115) gelang es sogar mit dieser Protease das Enzym von der Lipidhülle abzutrennen, zu isolieren und anschließend zu kristallisieren. BACHMAYER (8) weist besonders auf

die Proteolyseempfindlichkeit einzelner Neuraminidasen bei 37°C hin. Durch veränderte Reaktionsbedingungen -Absenken der Temperatur auf 4°C- gelang es ihm auch empfindliche Neuraminidasen mit Pronase von der Lipidhülle abzutrennen. In eigenen Versuchen führte die Pronasebehandlung des Virus bei 37°C in zwei Fällen zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität (Abb.9 und 10), in einem Fall kam es bei 37°C zu einer erheblichen Verminderung der enzymatischen Aktivität der NA (Abb.11). Bei 8°C konnte die N1 und die N2 in allen untersuchten Fällen ohne Aktivitätsverlust vollständig abgetrennt werden. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen veränderte sich der HA-Titer nicht oder nur um eine Titerstufe. Daraus kann geschlossen werden, daß das Hämagglutinin weder in großem Umfang abgetrennt noch inaktiviert wurde. Eine Inkubation des Virus bei 4°C führte praktisch zu keiner Abtrennung der Oberflächenantigene mehr.

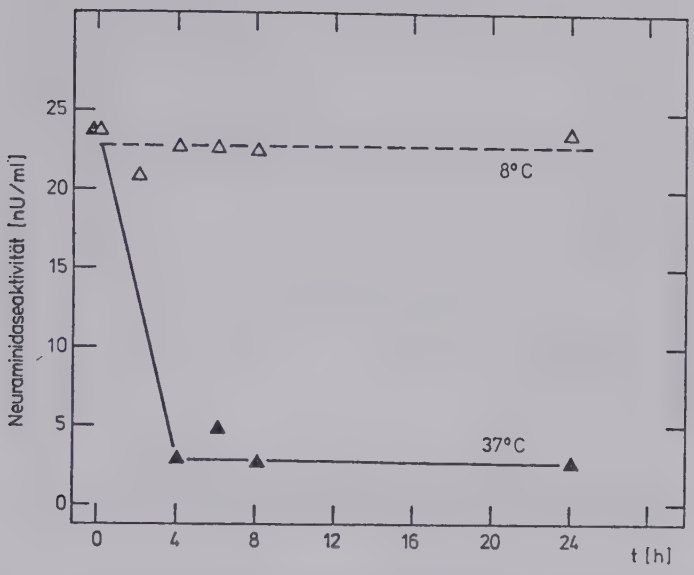


Abb.7 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Nagarsebehandlung von Influenza A/Tex/77 (Heq-1/N2) bei 8°C und 37°C.

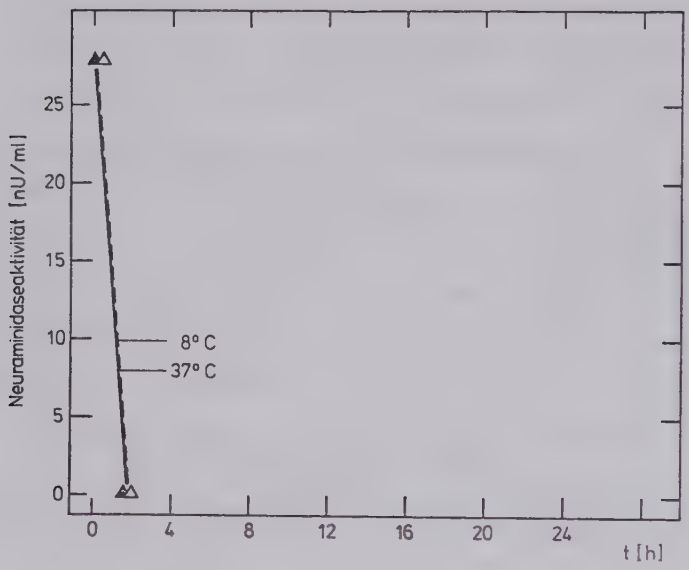


Abb.8 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Nagarsebehandlung von Influenza A/USSR/77 (Heq-1/N1) bei 8°C und 37°C.

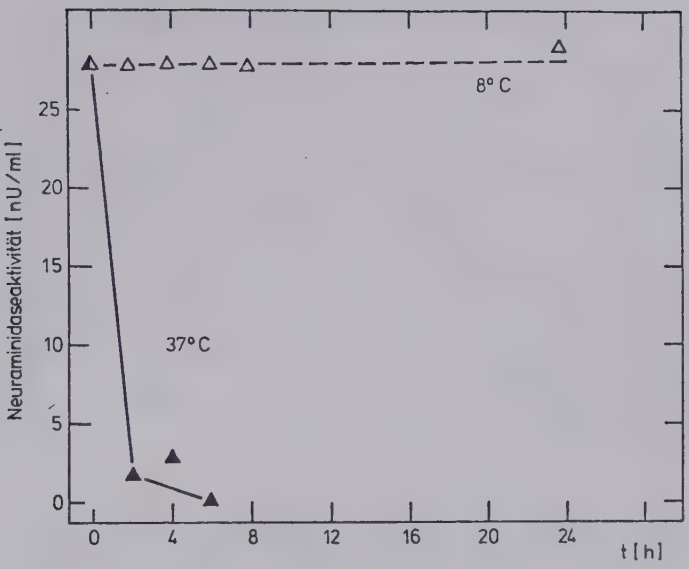


Abb.9 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Pronasebehandlung von Influenza A/USSR/77 (Heq-1/N1) bei 8°C und 37°C.

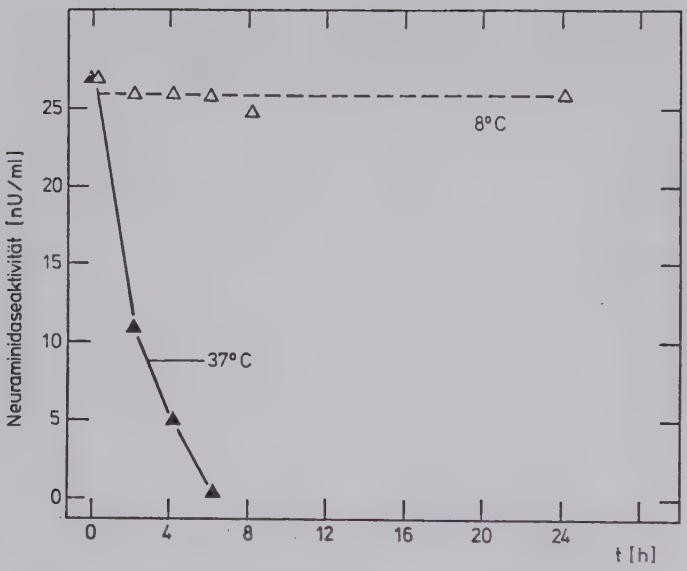


Abb.10 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Pronasebehandlung von Influenza A/Tex/77 (Heq-1/N2) bei 8°C und 37°C.

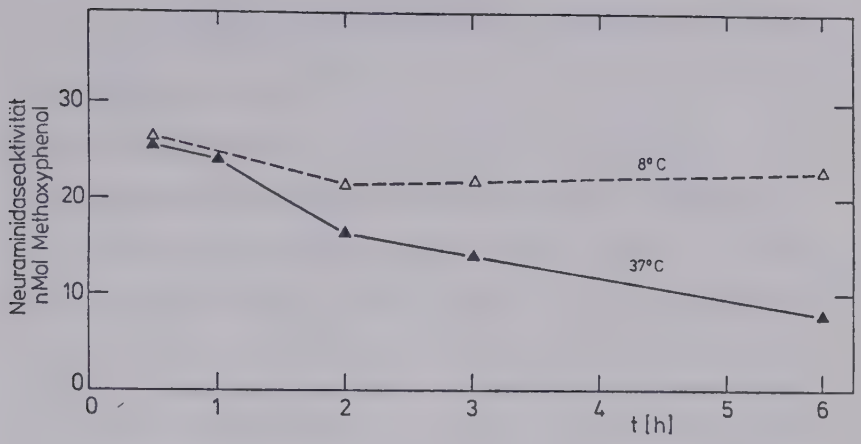


Abb.11 : Verhalten der Neuraminidaseaktivität bei Pronase-behandlung von Influenza A/Brazil/11/78 (H1/N1) bei 8°C und 37°C.

4.2 Auftrennung von Pronase und Neuraminidase.

Die enorme Empfindlichkeit der Neuraminidase gegenüber Proteasen bei höheren Temperaturen ließ Probleme bei der Durchführung des ELISA erwarten, da ohne entsprechende Versuche nicht sicher war, ob Inkubationstemperaturen von 37°C umgangen werden konnten. Es wurde versucht Neuraminidase und Pronase mit Hilfe der Saccharose--Gleichgewichtszentrifugation zu trennen. Es gelang das Antigen von der aktiven Protease abzutrennen (Abb.4). Das Vorgehen führte zu einem weiteren Verlust an Neuraminidase. In der neuraminidasehaltigen Fraktion des Lineargradienten sedimentierten in Relation zur eingesetzten Virusmenge zu große Proteinmengen; die Neuraminidase enthaltende Fraktion war offensichtlich noch mit Fremdantigenen verunreinigt. Bei diesem Fremdantigen handelte es sich entweder um bei neutralem pH inaktive Proteasen des Pronase--Proteasenkomplexes oder aber um Hämagglutinin.

4.3 Enzymmarkierung der Neuraminidase.

Es wurde versucht ca. 400ug proteasefreier NA mit Glutaraldehyd an Peroxydase zu koppeln. Wegen der geringen dafür zur Verfügung stehenden Antigenmenge - es konnten nur 10% der in der Anleitung angegebenen Menge eingesetzt werden- schien ein Erfolg von

vorneherein fragwürdig. Es gelang etwa 300 ug mit Peroxydase markierter Neuraminidase zu isolieren (Abb.12). Das Konjugat hatte nur eine minimale Peroxydase-aktivität. Der Zusatz von Glutaraldehyd zu einer Peroxydase/Neuraminidase-Mischung führte offensichtlich zu einer Verkopplung der Proteine. Nach einer Saccharosegleichgewichtszentrifugation konnte in einem Bereich des Gradienten NA-Aktivität festgestellt werden, in dem bei Vorliegen eines monomeren Neuraminidasemoleküls keine Enzymaktivität zu erwarten war (Abb.12). Der Versuch Peroxydase an Virusisolate zu koppeln, von denen das Kopplungsprodukt dann hätte abgespalten werden können, führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Auch durch eine Veränderung der Reaktionsbedingungen -pH-Wert, Temperatur und Inkubations-dauer- ließen sich die Ergebnisse nicht verbessern.

4.4 Anlagerung des Antigens an Mikrotiterplatten.

Auf Grund hydrophober Wechselwirkungen werden die meisten Proteine passiv an Kunststoffoberflächen adsorbiert. Bei weitem am Häufigsten wurden bei den beschriebenen Enzymimmunoassays die Antigene bzw. Antikörper an Polystyrol adsorbiert. Polystyrol-platten sind leicht beziehbar, relativ preisgünstig und lassen sich gut und reproduzierbar mit Proteinen

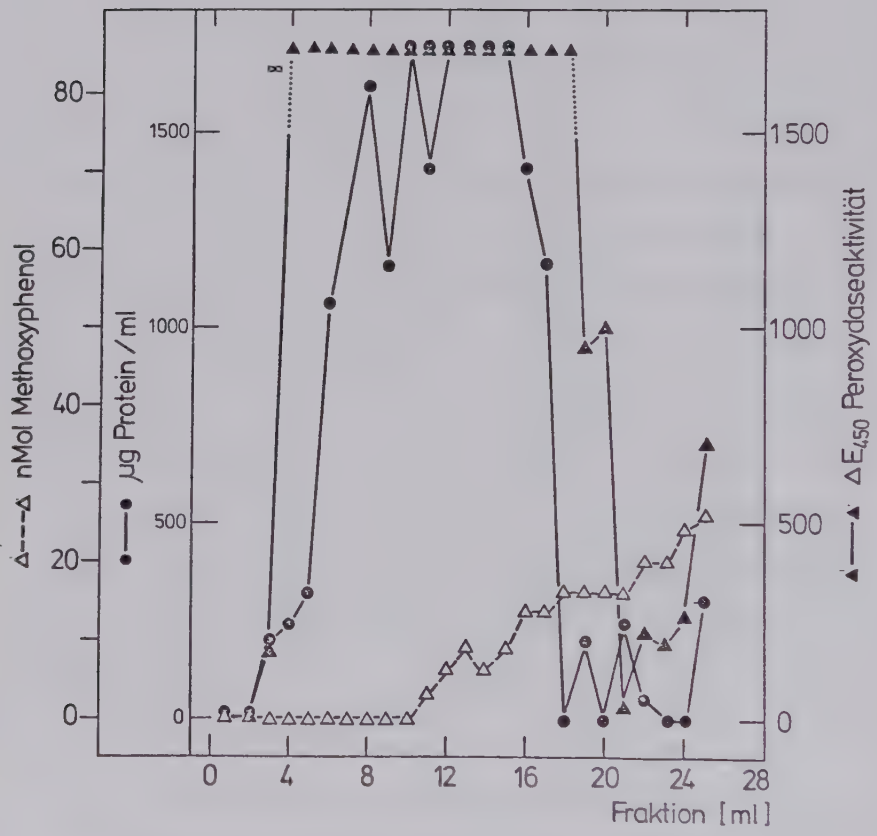


Abb.12 : Enzymmarkierung der Neuraminidase.
Kopplung von Meerrettichperoxydase an Neuraminidase.
Kopplungsbedingungen: In einem 0,14m Phosphatpuffer, der 1% Glutaraldehyd und 0,1% Lysin enthielt, werden Markerenzym und Antigen über 2h bei 22°C inkubiert.
Die Kopplungsprodukte werden anschließend auf einen Saccharose-Lineargradienten geschichtet und während eines 20 stündigen Zentrifugenlaufes bei 35 000 rpm aufgetrennt.
Die Abbildung zeigt die Verteilung der Kopplungsprodukte im Gradient. Die Neuraminidaseaktivität ist proportional der Anzahl der freigesetzten Methoxyphenolmoleküle.

beschichten. Polystyrol und andere Kunststoffplatten binden Antigene jediglich auf Grund physikalischer Wechselwirkungen, deswegen sind Antigenverluste bei der Durchführung des Testes in der Größenordnung von 20-30% (32,68) unvermeidlich. Durch diese Desorptionsvorgänge wird die Präzision und Sensitivität des Testes negativ beeinflußt. Auch bei der Adsorption von Proteinen an Nylonoberflächen kommt es während der Durchführung des Testes zu Antigenverlusten in derselben Größenordnung. Polyvinylchlorid-Mikrotiterplatten scheinen in dieser Hinsicht Vorteile zu bringen, der Antigenverlust während des Testes ist angeblich geringer.(36,68,120).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Antigen an Polystyrolplatten angelagert. Die für die Adsorption von Antigenen an Kunststoffoberflächen optimale Konzentration liegt in der Größenordnung von 1-10 ug/ml (31,108). Bei einer zu hohen Antigenkonzentration kann es verstärkt zu Prozonenphänomenen, zur sterischen Hinderung der Ag-Ak-Reaktion kommen (87). Bei zu niedrigen Konzentrationen des Antigens wird die Sensitivität des Testes negativ beeinflußt (18).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Antigenbeschichtung der Festphase eine Konzentration von 5 ug/ml proteasenfreier Neuraminidase gewählt. Wie schon früher

erläutert liegt die Neuraminidase auch nach Abtrennung der Pronase nicht rein vor. Eine Antigenkonzentration von 5 ug/ml entspricht der Konzentration, bei der gerade alle Anti-NA-Antikörper eines 1:50 verdünnten Serums mit hohem Antikörpertiter von dem an der Wand fixierten Antigen gebunden werden (Abb.13). Vor jeder Antigenbeschichtung der Plattenwand wurde die richtige Antigenkonzentration in einem Vorversuch bestimmt.

Die Platten wurden zur Antigenauskleidung 24h bei 4-8°C gelagert. Bei einer kürzeren Inkubationszeit muß bei dieser Temperatur mit einer verminderten Antigenbindung gerechnet werden (26). Die niedrige Inkubationstemperatur schien wegen der Empfindlichkeit des Antigens angebracht. Für die Anlagerung des Antigens an die Polystyrolwand wurde ein neutraler Puffer (PBS) gewählt, da sich in der Literatur Hinweise fanden, daß ein mehr alkalischer oder mehr saurer Puffer zu einer verstärkten Desorption des Antigens von der Plattenwand führen würde (32). ROSENTHAL (84) trocknet das Antigen an die Plattenwand an und fixiert es anschließend mit Methanol, offensichtlich in der Absicht die Ausbeute an gebundenem Antigen zu verbessern. Der Versuch NA in der von ROSENTHAL

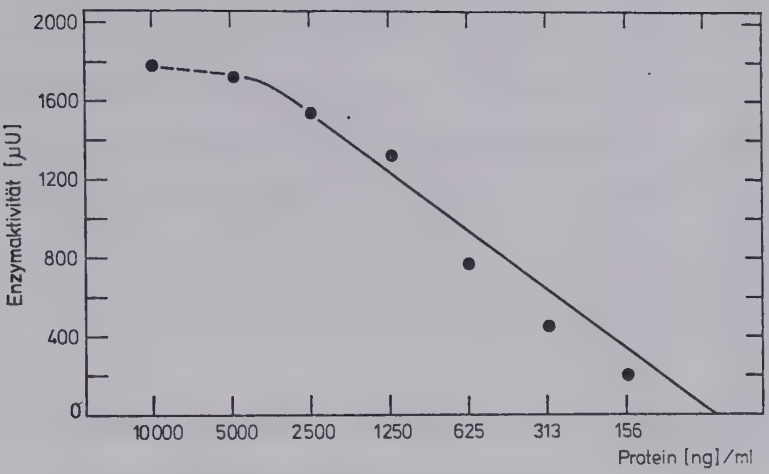
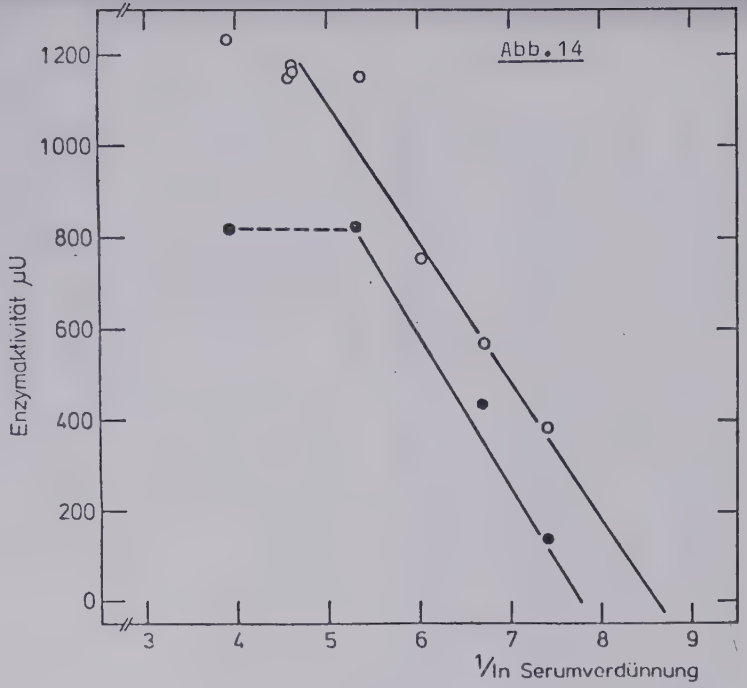


Abb.13 : Abhängigkeit der Menge der enzymimmunologisch nachgewiesenen Antikörper von der Konzentration des Antigens an der Plattenwand.

Auf der Abszisse wurde die Konzentration der bei der Antigenbeschichtung der Festphase verwendeten Antigenstammlösung aufgetragen.
Die auf der Ordinate aufgetragene Enzymaktivität ist proportional der Menge der an der Festphase gebundenen Antikörper (Inkubation der Festphase mit einem Anti-NA-Antikörper enthaltenden 1:50 verdünnten Serums).

beschriebenen Technik in besserer Ausbeute an die Polystyrolwand anzulagern erwies sich nicht als vorteilhaft. Die Menge des gebundenen und antigenisch wirksamen Antigens war, trotz vorheriger Abtrennung der Protease, bei einer Antrocknung der Neuraminidase an die Festphase deutlich geringer als bei passiver Adsorption über 24h bei 4-8°C. Eine Fixierung mit Methanol führte zu weiteren Antigenverlusten (Abb.14 und 15).

Die Adsorption von Proteinen an Kunststoffoberflächen ist ein unspezifischer Vorgang. Im Verlauf eines ELISA kommt es nicht nur zu den erwünschten spezifischen Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern, sondern auch zu einer nicht spezifischen Adsorption von Globulinen und markierten Antiglobulinen an die Kunststoffoberfläche oder an die passiv an die Polystyrolwand angelagerten Eiweißmoleküle. Diese unspezifische Adsorption kann zu falsch positiven Ergebnissen führen; sie beeinflußt die Spezifität des Testes damit negativ. Durch Zugabe von Detergentien, die in keiner Weise die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflußen, kann eine Ausbildung hydrophober Bindungen mit der Plattenwand vermieden werden. Zur Verhinderung einer unspezifischen Adsorption kann die Plattenwand zusätzlich mit Rinderalbumin (30,37,87,107), einer



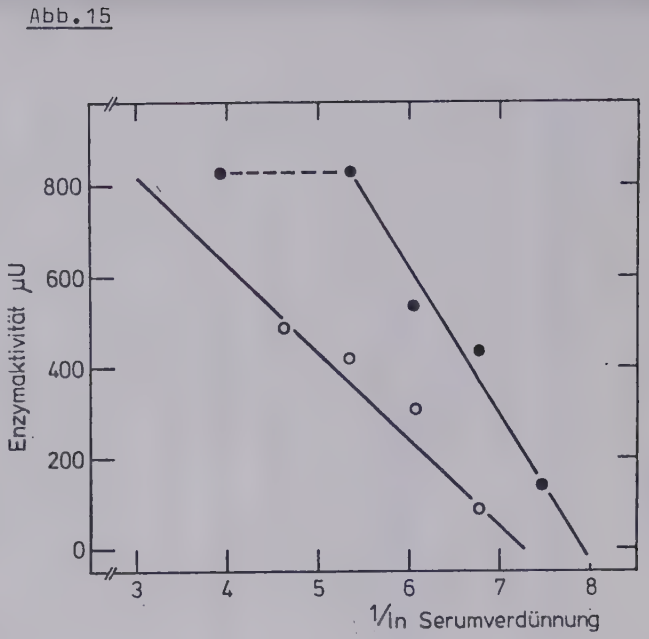


Abb.14 und 15 : Abhängigkeit der Antigenkonzentration an der Festphase von dem bei der Antigenfixierung verwendeten Verfahren. Auf der Abszisse wurde der Verdünnungsgrad eines Testserums aufgetragen. Die auf der Ordinate aufgetragene Enzymaktivität ist der Antigenkonzentration an der Festphase indirekt proportional.

Abb.14 : Bei einer Adsorption des Antigens an die Festphase bei 8°C über 24h (o—o) findet man eine deutlich höhere Antigenkonzentration an der Plattenwand als bei Antrocknung des proteasenfreien Antigens an die Polystyrolwand bei 37°C über 6h (●—●).

Abb.15 : Bei einer zusätzlichen"Fixierung" (o—o) des an die Festphase angetrockneten Antigens mit Methanol, nimmt die Antigenkonzentration an der Plattenwand weiter ab.

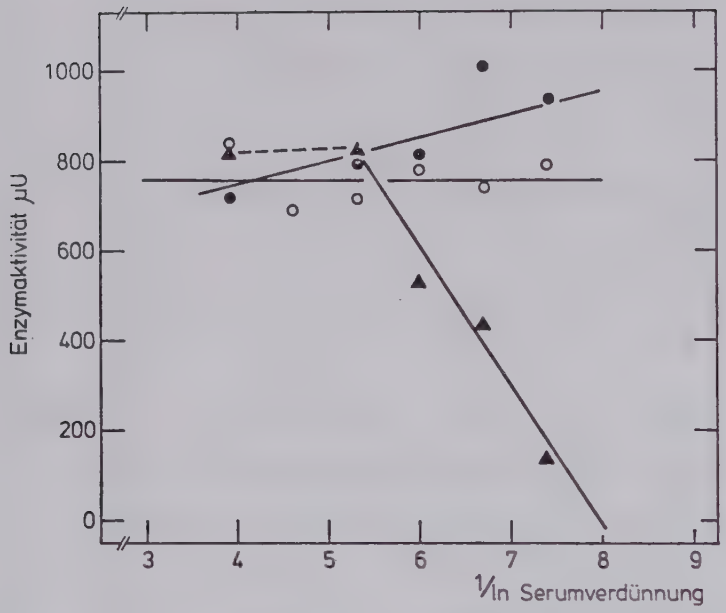


Abb.16 : Verhinderung einer unspezifischen Immunglobulin-adsorption an die Polystyrolwand durch Absättigung der Festphase mit 5%iger Rinderalbuminlösung.

Ohne Absättigung der antigentragenden Festphase wird durch unspezifische Antikörperadsorption an die Polystyrolwand ein hoher Antikörpergehalt des getesteten Serums vorgetäuscht (o—o) .
Auch wenn die Festphase kein Antigen trägt kommt es ohne Albuminabsättigung zu einer starken unspezifischen Adsorption von Antikörpern an die Platten (●—●) .
Bei Albuminabsättigung der antigentragenden Plattenwand wird eine unspezifische Adsorption weitgehend vermieden (Δ—Δ).

Gelatinelösung (68) oder einem Fremdserum (wegen Wechselwirkungen mit dem Enzym-Antigen-Komplex weniger geeignet) beschichtet werden. Durch Auskleidung der Plattenwand mit 5%igem Rinderalbumin, das 2% Natriumazid enthielt, konnte auch in eigenen Versuchen eine unspezifische Adsorption an die Plattenwand weitgehend blockiert werden (Abb.16). Bei einzelnen Seren kommt es auch danach noch zu einer unspezifischen Adsorption an die Festphase. Diese unspezifische Adsorption konnte durch mehrfaches Spülen der Platten mit einer 0,5% Tween 20 enthaltenden Pufferlösung und ausreichender Verdünnung der im Test eingesetzten Seren beseitigt werden. Die Verwendung von Azid im Verlauf des Testes erfordert den Einsatz von alkalischer Phosphatase als Markerenzym, da Peroxydase durch Azid gehemmt wird.

4.5 Anwendung des ELISA und Qualitätskriterien des Testes

Die Genauigkeit des Testes, das Ausmaß, in dem das Durchschnittsergebnis einer Anzahl von Einzelmessungen mit dem wahren Wert zusammenfällt, hängt von einer Reihe von Faktoren ab (82,95):

- Der Aufarbeitung und Reinheit des Antigens
- Der korrekten und in der Ausführung konstanten Durchführung des Testes

- Der Auswahl eines geeigneten Standards

Bei der Isolierung des Antigens mußte ein Kompromiß zwischen den Anforderungen des Testes, in dem ein möglichst reines Antigen eingesetzt werden sollte, und den Schwierigkeiten Antigen in genügender Menge rein darzustellen, gefunden werden. Die einzelnen Reinigungs- und Isolierungsschritte führten jeweils zu nicht unerheblichen Antigenverlusten. So kann schon die kurzfristige Erwärmung einer NA/Proteasen-mischung zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität des Enzyms führen, wie die Versuche in Abschnitt 4.1 zeigen.
Die Auswahl eines geeigneten Standards erfolgt durch Vergleich der Ergebnisse des Immunoassays mit einem etablierten Testsystem, dem Neuraminidase-Hemmtest.

Die Zugabe von spezifischen artfremden Antiseren gegen die N1 führte zu einer Verminderung der Enzymaktivität (Nachweis der Spezifität).
Mit Hilfe des Enzymimmunoassays können Seren mit niedrigem Antikörpertiter nicht sicher von Seren unterschieden werden, die keine Antikörper enthalten. Bei den Seren 4A,8A,10A,19A,30A,38A,43A,82A -um einige Beispiele aus Tabelle 1 zu nennen- kann allein auf

Grund der Ergebnisse des ELISA nicht entschieden werden, ob das betreffende Serum Antikörper in niedrigem Titer oder aber keine Antikörper gegen die Neuraminidase enthält.

Um die Ergebnisse des Immunoassays auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurden sie mit Ergebnissen aus dem Neuraminidase-Hemmtest, die mir freundlicherweise von Frau Mok-Hsu (74) zu Verfügung gestellt wurden, verglichen (Tabelle 1). Mit beiden Methoden wurden während einer Impfaktion die Seren der Probanden vor der Impfung (Serie A), nach der Impfung (Serie B) und nach der 2.Impfung (Serie C) auf ihren Anti-NA-Antikörpergehalt hin untersucht. Ein Titeranstieg nach der Impfung konnte mit Hilfe des ELISA in Übereinstimmung mit dem Neuraminidase-Hemmtest in den meisten Fällen nachgewiesen werden. Jediglich bei zwei der untersuchten Probanden konnte ein im Hemmtest festgestellter Titeranstieg mit dem ELISA nicht nachvollzogen werden. Mögliche Ursachen für diese falsch negativen Befunde (Rheumafaktoren; IgM-Antikörper gegen das Antigen, die in diesem ELISA nicht nachgewiesen werden) wurden nicht untersucht. In quantitativer Hinsicht ergaben sich teilweise erhebliche Differenzen zwischen Hemmtest einerseits und ELISA andererseits.

Doppelbestimmungen -Testung deselben Serums in der gleichen Versuchreihe auf derselben Polystyrrolplatte - zeigten eine gute Konstanz der Meßwerte bei identischen Meßbedingungen (Testreihe 2 und 3 in Tab.2). Auch bei der Durchführung des Testes an verschiedenen Tagen bei sonst gleichen Bedingungen ließen sich die einzelnen Meßwerte gut reproduzieren (Testreihe 1 im Vergleich zu Testreihe 2 und 3 in Tab. 2). Die Testwiederholung mit neu beschichteten Platten ergab leicht von den Vorversuchen abweichende Meßwerte (Testreihe 4 im Vergleich zu den Testreihen 1,2 und 3 in Tab. 2); ein Hinweis darauf, daß die einzelnen Ergebnisse u.a. von der Antigenkonzentration an der Festphase abhängen.

Der Test ist ausreichend sensitiv. In antikörperhaltigen Seren können in den meisten Fällen Antikörper noch bis zu einer Serumverdünnung von 1:800 nachgewiesen werden. Es gelingt noch mit Nanogrammengen Antigen Antikörper -wohl in derselben Größenordnung- nachzuweisen.

TABELLE 1

	Serie A		Serie B		Serie C	
Serum-Nr.	NIT	ELISA	NIT	ELISA	NIT	ELISA
1	6	500	398	6600	316	6600
2	<1	100	<1	300	<1	200
3	<1	100	40	900	40	1200
4	5	400	355	1400	200	2200
8	6	100	25	500	63	1100
10	5	200	158	3000	200	12000
12	<1	0	<1	400	1	1100
13	-	400	-	300	-	200
14	<1	100	<1	0	4	300
15	-	2300	-	2100	-	2400
16	<1	0	<1	0	1	200
19	10	200	32	200	13	200
27	<1	100	<1	200	2	200
30	1	300	20	11500	20	10900
32	-	200	-	2800	-	3500
33	<1	100	<1	200	<1	600
38	100	200	251	600	100	2000
39	-	700	-	1700	-	4900
43	63	400	200	1000	158	1000
44	7	700	100	14000	87	11500
45	3	600	71	2200	65	1100
47	<1	400	234	31000	309	36000
49	<1	200	20	6600	20	5700
50	<1	0	<1	400	3	700
79	6	0	93	0	98	0
82	3	400	27	1800	31	2300
91	89	2800	275	17000	219	12000
103	20	700	89	1900	71	1500
104	-	800	-	2200	-	2600
111	<1	200	<1	400	4	600
120	6	100	234	5200	83	5700
129	<1	0	<1	500	2	400

TABELLE 2 : Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Testansätzen

Serum-Nr.	Verdünnung	Testansatz (uU)			
		1	2	3	4
103A	1:50	695	550	598	598
	1:100	550	440	356	513
	1:200	331	331	283	525
	1:400	149	174	113	234
	1:800	0	0	0	52
	1:1600	0	0	0	0
103B	1:50	938	805	901	634
	1:100	720	744	756	598
	1:200	732	756	720	550
	1:400	647	574	550	258
	1:800	392	392	295	137
	1:1600	0	0	0	0
103C	1:50	938	986	962	732
	1:100	889	817	708	586
	1:200	671	610	610	465
	1:400	392	428	392	319
	1:800	198	198	113	174
	1:1600	0	0	0	0
104A	1:50	829	598	793	610
	1:100	659	513	574	488
	1:200	331	307	392	392
	1:400	234	137	222	113
	1:800	-	0	0	64
	1:1600	-	0	0	0

TABELLE 2 (FORTSETZUNG)

Serum-Nr.	Verdünnung	Testansatz (uU)			
		1	2	3	4
104B	1:50	998	986	938	695
	1:100	998	841	756	708
	1:200	780	695	598	586
	1:400	647	537	513	537
	1:800	-	295	258	198
	1:1600	-	40	4	40
104C	1:50	938	974	938	732
	1:100	768	720	695	598
	1:200	598	550	477	428
	1:400	465	453	331	307
	1:800	-	271	246	246
	1:1600	-	0	0	0
120B	1:50	914	853	962	-
	1:100	889	865	841	817
	1:200	780	805	708	634
	1:400	574	659	695	453
	1:800	-	453	440	356
	1:1600	-	295	234	186
120C	1:50	1083	877	865	610
	1:100	853	817	793	598
	1:200	720	793	720	-
	1:400	550	622	586	-
	1:800	-	453	198	477
	1:1000	-	416	258	356

Testansatz 2 und 3 sind Doppelbestimmungen im gleichen Versuchsansatz und mit identischen Antigenkonzentrationen an der Festphase (gleiche Plattencharge). Versuchansatz 1 und 4 wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt und in Versuchsansatz 4 wurde zusätzlich eine andere Plattencharge verwendet.

5. Diskussion

5.1 Isolierung der Neuraminidase.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Testsystem zu entwickeln, mit dessen Hilfe Anti-NA-Antikörper nachgewiesen werden sollten. Der Test sollte durch gleichzeitig vorhandene Anti-HA-Antikörper nicht gestört werden, und die Methode sollte auch bei neu auftretenden Antigenvarianten ohne aufwendige Vorarbeiten schnell verfügbar sein. Um diese Ziele zu erreichen, mußten die beiden Oberflächenantigene entweder getrennt oder das Hämagglutinin selektiv zerstört bzw. in einem Rekombinantenstamm durch ein irrelevantes Hämagglutinin ersetzt werden.

Die Herstellung von Rekombinanten ist im Vergleich zur Abtrennung und Isolierung der Oberflächenantigene zeitaufwendiger. Dabei können sich zudem bestimmte Eigenschaften des Antigens ändern. KENDAL (50) weist darauf hin, daß es bei der Rekombinantenzüchtung zu einer Änderung der Stabilität der NA kommen kann. Es ist vorstellbar, daß auch die antigenen Eigenschaften des Moleküls während der Rekombinantenzüchtung nicht in jedem Fall konstant bleiben.

Eine Isolierung der Neuraminidase wird erst möglich,

wenn die die beiden Oberflächenantigene verbindende Lipidmembran aufgelöst oder die beiden Antigene von der Membran abgetrennt werden (17).

Durch eine Behandlung des Influenza-Virus mit anionischen Detergentien gelingt es die Lipidhülle aufzulösen und alle Antigene in Lösung zu bringen (43, 62,63,99,112). Das Verfahren wurde insbesondere zur Isolierung der N2 -ein im Vergleich zur N1 robusteres Molekül, das durch Detergentienbehandlung nicht zerstört wird- angewandt.
Mit kationischen Detergentien können die Oberflächenantigene des Virus von den Core-Antigenen abgetrennt werden, ohne daß es dabei zu einer Auflösung des Core kommt (5,56). Eine Behandlung des Virus mit Detergentien führt zur Lösung nicht-kovalenter, auf physikalischen Wechselwirkungen beruhender Bindungen zwischen hydrophoben Anteilen der Oberflächenantigene und der Lipidmembran. Kovalente Bindungen werden nicht angegriffen. Das Verfahren führt häufig zu einer Zerstörung der Neuraminidase-Aktivität (28,39,61,64,65, 66,92,112). Bei diesem Verfahren wird die Lipidmembran des Virus zerstört. Bestandteile des Core werden gelöst und müssen durch aufwendige Verfahren von den Oberflächenantigenen abgetrennt werden.

Eine quantitative Trennung von Hämagglutinin und Neuraminidase durch Adsorption an Erythrocyten ist erst nach Entfernung des Detergens möglich. In Gegenwart des Detergens werden Neuraminidasemoleküle in HA/NA-Mischaggregaten an die Erythrocytenmembran adsorbiert (63). Die Entfernung eines Detergens aus einem HA/NA-Gemisch führt zur Bildung von Mischaggregaten aus HA und NA (65) und in einzelnen Fällen zu einer Zerstörung der Neuraminidaseaktivität (39). Solche Aggregate, die durch Zusammenlagerung hydrophober Molekülanteile entstehen, können durch eine erneute Detergentienbehandlung nicht mehr in Lösung gebracht werden (28). Eine Behandlung des Virus mit Detergentien und Enzymen verhindert die Aggregation der Moleküle (28,29) in Abwesenheit eines Lösungsvermittlers (67). Eine Abtrennung des Detergens nach der Spaltung des Virus mit Detergentien ist problematisch. Eine Anlagerung von Proteinen an eine Kunststoffwand (z.B. Polystyrrol) ist in Gegenwart von Detergentien nicht möglich. Im Gegenteil: Detergentien verhindern eine Proteinadsorption an Testplatten.

Eine Verwendung von Detergentien schien zu unlösbaren Problemen bei der Durchführung des ELISA zu führen; es wurde deswegen versucht, die Oberflächenantigene

des Virus mit Proteasen abzutrennen. Proteasen greifen kovalente Bindungen an und führen zur teilweisen oder - unter aggressiveren Bedingungen- zu einer vollständigen Zerstörung des Hämagglutinins und/oder der Neuraminidase. Die inneren Antigene des Influenza-Virus werden von einer Lipidhülle umgeben, in der Neuraminidase- und Hämagglutininmoleküle oberflächlich verankert sind.
Die Lipidmembran wird durch eine Proteasenbehandlung des Virus in keiner Weise verändert (55,57,58,69,94). Die inneren Antigene werden durch die Lipidschicht vor einer Einwirkung der Proteasen geschützt. Das Core kann nach dem Abspalten der Oberflächenantigene durch Enzyme quantitativ durch Ultrazentrifugation entfernt werden. Der Überstand des Zentrifugats enthält jediglich HA, NA und Protease, jedoch keine Coreanteile. Proteasen trennen den distalen, hydrophilen Anteil des Neuraminidasemoleküls von seinem hydrohoben in der Lipidhülle verankerten Teil ab. Der abgetrennte Teil, ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 48 000 Dalton (116), ist Träger der enzymatischen Aktivität und der antigenen Determinanten des Moleküls. Eine Abtrennung der NA unter schonenden Bedingungen führt nicht zu einer Zerstörung des aktiven Zentrums oder der antigenen Eigenschaften der Neuraminidase(59,61).

Eine Proteasenbehandlung des Virus bei höheren Temperaturen führt häufig zu einer Zerstörung des Moleküls.

Eine selektive Zerstörung des Hämagglutinins mit Proteasen wurde mehrfach beschrieben (10,19,40,48,50). Es scheint, daß auf diesem Weg die Hämagglutinine einzelner Influenzastämme zerstört und gleichzeitig die Neuraminidase abgetrennt und isoliert werden kann (40,48,50). Diese Methode ist jedoch nicht allgemein anwendbar. Es wurde wiederholt gezeigt, daß das HA zahlreicher Stämme nicht oder wenig proteasenempfindlich ist. Häufig erwies sich die Neuraminidase gegenüber Proteasen empfindlicher als das Hämagglutinin (16,22,59). BRAND (16) etwa gelang eine Isolierung des Hämagglutinins bei gleichzeitiger vollständiger Zerstörung der Neuraminidase.

Für die allgemeine Anwendbarkeit des Testes ist es wichtig, daß jede Neuraminidase -auch eine instabile oder proteasenempfindliche- isoliert werden kann. Dazu mußte eine Methode gefunden werden, mit der auch empfindliche Neuraminidasen von den anderen Virusantigenen abgetrennt werden können. Eine Abtrennung auch empfindlicher Neuraminidasen gelingt durch eine Proteasenbehandlung des Virus bei $8^{o}C$.

Unter diesen Bedingungen wird das Hämagglutinin nicht oder nur zu einem geringeren Teil von der Lipidhülle abgetrennt. Abgetrenntes Hämagglutinin kann aus einem HA/NA-Gemisch durch wiederholte Inkubation des Gemisches mit Erythrocyten, an die es sich anlagert und anschließender niedertouriger Zentrifugation zur Abtrennung der mit HA beladenen Zellen praktisch zu 100% abgetrennt werden. Die Neuraminidasemoleküle lagern sich kaum an die roten Blutkörperchen an (27,65).

Eine Abtrennung der Protease gelingt mit Hilfe der Gleichgewichtszentrifugation über 20h. Eine Abtrennung des Enzyms ist nur nötig, wenn bei der Anlagerung des Antigens an die Wand der Testplatte höhere Temperaturen erforderlich sind. Höhere Temperaturen erwiesen sich bei dem in dieser Arbeit gewählten Verfahren zur Anlagerung der Neuraminidase an eine Festphase als nicht notwendig. Es zeigte sich, daß eine Anlagerung des Antigens bei $4^{o}C$ auch ohne Abtrennung der Protease nicht zu nennenswerten Antigenverlusten führt. Bei Verwendung von Rekombinanten mit irrelevantem Hämagglutinin ist eine Abtrennung des Hämagglutinins aus einem HA/NA-Gemisch natürlich nicht erforderlich.

5.2 Enzymmarkierung der Neuraminidase

Mit Hilfe von Reagenzien, die an entgegengesetzten Polen des Moleküls zwei reaktionsfähige Gruppen enthalten, können Enzyme kovalent mit anderen Proteinen verbunden werden. Die für diesen Zweck am meisten verwendeten Reagenzien sind $\alpha\omega$-Dialdehyde, besonders Glutaraldehyd (2,51,83).
Glutaraldehyd führt zur irreversiblen Kopplung von Proteinen. Der antigene Charakter bzw. die enzymatische Aktivität der Reaktionspartner wird dabei in den meisten Fällen nicht drastisch verändert (2,3).
Glutaraldehyd liegt in wässriger Lösung nicht als Monomer, sondern als Polymer mit erheblichem Anteil α,β-ungesättigter Aldehyde vor (83,86). Dieser "Glutaraldehyd" reagiert mit N-terminalen Aminogruppen von Peptiden und mit ε-Aminogruppen von Aminosäuren (41). Dabei entstehen keine einheitlichen Reaktionsprodukte, sondern Di-/Oligo-/Polymere der im Reaktionsgemisch vorliegenden Proteine (2).

Als Markerenzym wurde in der vorliegenden Arbeit Peroxydase gewählt, da dieses Enzym eine hohe Aktivität hat, zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt führt und auf Grund seines niedrigen Gehaltes an freien

Aminogruppen weniger Homopolymere bildet (95,108).

In zahlreichen Arbeiten wird über eine niedrige Ausbeute bei Proteinkopplungsreaktionen berichtet (9,31,35,76,95,105). SCHUURS (95) weist darauf hin, daß der Erfolg solcher Reaktionen von der Einhaltung bestimmter Rahmenbedingungen abhängig ist: Der pH-Wert, die Reaktionszeit, die Temperatur und das Verhältnis Protein/Enzym müssen optimal sein. Das Verhältnis der zu koppelnden Proteine ist für unterschiedliche Reaktionspartner verschieden. Das für eine Kopplungsreaktion optimale, spezifische Verhältnis von Neuraminidase und Peroxydase ist nicht bekannt. Es ist möglich, daß bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen eine zu geringe Neuraminidasekonzentration mitverantwortlich für die geringe Ausbeute an markiertem Antigen war. ENGVALL (31) verwendet zur Kopplung von Proteinen "technischen Glutaraldehyd", in dem die Glutaraldehyd-Moleküle überwiegend als Oligo- bzw. Polymere vorliegen. Die Verwendung von monomerem Glutaraldehyd sieht ENGVALL als die Hauptursache für Mißerfolge bei Proteinkopplungsreaktionen an. Legt man der Reaktion den von RICHARDS (83) angenommenen Mechanismus zu Grunde, erscheint es sehr gut möglich, daß die

Verwendung von reinem, monomerem Glutaraldehyd in der vorliegenden Arbeit zu der schlechten Ausbeute bei der Enzymmarkierung der Neuraminidase geführt hat.

5.3 Bestimmung von Anti-NA-Antikörpern

Zur Bestimmung von Anti-NA-Antikörpern steht der von der WHO empfohlene sehr spezifische, sehr sensitive Neuraminidase-Hemmtest zur Verfügung (4). Mit Hilfe dieses Testes können Antikörper gegen Neuraminidase und Hämagglutinin, die beiden Oberflächenantigene des Influenza-Virus, nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen Antikörper müssen nicht obligat am aktiven Zentrum des Enzyms angreifen (27). Es scheint, daß die Bindung von gegen eines der beiden Oberflächenantigene gerichten Antikörpern zur räumlichen Behinderung der Umsetzung großmolekularer Substrate durch die Neuraminidase führt. Die Tatsache, daß kleine Substrate auch in Gegenwart spezifischer Antikörper umgesetzt werden können, zeigt, daß die Ursache der Enzymhemmung durch Antikörper in der sterischen Hinderung der Enzymaktion durch Anti-HA-bzw. Anti-NA-Antikörper zu suchen ist. Auch ausschließlich gegen das Hämagglutinin gerichtete Antikörper können die Neuraminidaseaktivität gegenüber großmolekularen

Substraten beeinträchtigen. Deswegen ist es notwendig vor der Durchführung des Hemmtestes Hämagglutinin und Neuraminidase zu trennen oder im Test eine Rekombinante mit irrelevantem HA einzusetzen. Der Neuraminidase-Hemmtest ist zur Durchführung größerer Untersuchungsreihen nicht geeignet, da er sehr zeit- und materialaufwendig ist. Auf den Einsatz organischer Lösungsmittel und toxischer Substanzen (Arsen) kann bei diesem Test nicht verzichtet werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein dem Enzymhemmtest hinsichtlich Spezifität und Sensitivität nicht unterlegener, zur Untersuchung großer Serumkollektive geeigneter, weniger zeit- und materialaufwendiger Test zum Nachweis von Anti-Neuraminidase-Antikörpern entwickelt werden. Diese Kriterien erfüllen radio- oder enzymimmunologische Nachweismethoden.

Der radioimmunologische Nachweis von Antikörpern erfordert ein mit teuren Geräten ausgestattetes Speziallabor, besondere Sicherheitsvorkehrungen und ein im Strahlenschutz ausgebildetes Personal. Die bei Radioimmunoassays verwendeten markierten Antigene oder Antikörper sind bestenfalls einige Wochen stabil. Gegenüber einem Enzymimmunoassay

haben radioimmunologische Nachweismethoden den Vorteil, daß sie um den Faktor 10 (71,73) sensitiver sind. Der ELISA hat dafür andere entscheidende Vorzüge (11,89,114):

- er ist technisch einfacher
- es werden keine toxischen oder strahlenden Substanzen verwendet
- die enzymmarkierten Proteine sind über Monate, wahrscheinlich sogar über Jahre stabil
- aufwendige und teure Geräte sind zur Durchführung eines ELISA nicht erforderlich, ein Photometer reicht aus

Die Sensitivität enzymimmunologischer Nachweismethoden ist hoch. WATANABE (110,111) berichtet von einem enzymimmunologischen Nachweis bis zu 1,6ng Anti-HA--Antikörpern und einem möglichen Nachweis von Anti-NA--Antikörpern bis in eine Größenordnung von 50-75ng; die Oberflächenantigene waren vor diesen Versuchen nicht von der Lipidhülle des Virus abgetrennt worden. MAIOLINI (71) gelang der Nachweis von 1ng Alpha-Fetoprotein mit Hilfe des ELISA und von 0,1ng mit Hilfe eines RIA. Nach MIYAI (73) liegt die enzymimmunologische Nachweisgrenze für TSH bei 4,5ng, die radioimmunologische bei 0,1ng. Die Sensitivität des ELISA kann durch Verwendung fluoreszierender Substrate weiter verbessert werden (12).

Die Spezifität des ELISA ist abhängig von der Reinheit des Antigens. Bei gut gereinigtem Antigen ist die Spezifität enzymimmunologischer Nachweismethoden hoch (11,33,72,114).
Der ELISA ist ein bei großen Untersuchungsreihen einsetzbarer Test. Wenn Platten mit adsorbiertem Antigen vorhanden sind, kann die Antikörpermenge gegen dieses Antigen in einem gegebenen Serum innerhalb eines Arbeitstages ohne großen Aufwand bestimmt werden.
Um spezifisch gegen die Neuraminidase gerichtete Antikörper nachzuweisen, ist es allerdings erforderlich Neuraminidase und Hämagglutinin zu trennen; das kann auch im Hemmtest nicht vermieden werden.

Der enzymgebundene Immunoassay kann als kompetitiver oder nicht-kompetitiver Test durchgeführt werden.
Bei einem kompetitiven Assay wird das Antigen zunächst an einen geeigneten Träger angelagert. Einer genau definierten Menge markierten Antikörpers wird in den mit Antigen beschichteten Platten eine bekannte Menge nicht markierten Antikörpers als Standard oder aber die zu untersuchende Serumprobe in geeigneter Verdünnung zugesetzt. Nach ausreichendem Spülen der Festphase wird die Enzymaktivität des an das Antigen gebundenen enzymmarkierten Antikörpers bestimmt. Die Antikörper-

konzentration der untersuchten Probe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Testantigens. Ein kompetitiver Immunoassay ist wahrscheinlich etwas sensitiver als ein nicht-kompetitiver Assay (119). Die Menge des Standardantikörpers bzw. -antigens ist bei einem kompetitiven Assay im Gegensatz zum nicht-kompetitiven Assay genau definierbar. Diesen Vorteilen des kompetitiven Assays gegenüber einem nicht-kompetitiven Assay stehen einige wesentliche Nachteile gegenüber. Bei einem kompetitiven Assay ist es notwendig spezifische Antikörper mit Enzymen zu markieren. Einem Nachweis von Anti-NA-Antikörpern müßten aufwendige Isolierungs- und Immunisierungs-Schritte vorrausgehen. Die Immunisierung von Versuchstieren mit Neuraminidase führt nicht immer zur Bildung von spezifischen Antikörpern, auch ist zur Immunisierung eine ausreichende Antigenmenge erforderlich. Zur Isolierung von nur einem Milligramm Neuraminidase werden aber bei günstigen Vorraussetzungen (ausreichender Neuraminidaseanteil am Gesamtvirus, relativ unempfindliche Neuraminidase) zwischen 2 und 31 Allantoisflüssigkeit benötigt. Es ist leicht vorstellbar, daß ein solcher kompetitiver Enzymimmunoassay bei einem neu auftretenden durch Antigen-Shift oder Drift veränderten Antigen erst nach frühestens

2-3 Monaten zum Nachweis korrespondierender Antikörper einsetzbar wäre. Bei kompetitiven Immunoassays müssen enzymmarkierte Antikörper oder Antigene zusammen mit Serum inkubiert werden. Serum kann Proteasen und Enzyminhibitoren enthalten, die die Aktivität des Markenzyms beeinflussen können, ein weiterer Nachteil dieser Assays (31). Schon bei der Versuchsplanung schienen die Nachteile des kompetitiven Assays die Vorteile so zu überwiegen, daß auf seine Durchführung verzichtet wurde.

Bei einem nicht-kompetitiven oder Sandwich-Assay wird ein an eine Festphase angelagertes Antigen mit einem ausreichend verdünnten Serum inkubiert. Nach einiger Zeit (i.a.3h) wird die Festphase gespült und die Menge des an das Antigen angelagerten Antikörpers mit Hilfe eines enzymmarkierten Anti-Immunglobulins nachgewiesen. Die Enzymaktivität ist proportional der Antikörperkonzentration der untersuchten Probe. Dasselbe markierte Anti-Immunglobulin kann zum Nachweis der unterschiedlichsten Antigene eingesetzt werden; es ist kommerziell erhältlich und steht jederzeit zur Verfügung. Zur Durchführung des Testes ist zwar eine Isolierung des Antigene, nicht aber die Produktion spezifischer Antikörper

erforderlich. Die benötigten Antigenmengen sind sehr gering. Die zur Antigenisolierung benötigten Virusmengen können innerhalb weniger Tage durch Beimpfung embryonierter Hühnereier gewonnen werden.

Ein entscheidender Nachteil eines Sandwich-Assays ist, daß er durch Rheumafaktoren gestört werden kann. Rheumafaktoren können vor Versuchsbeginn durch Inkubation des Serums mit IgG-Aggregaten aus dem zu untersuchenden Serum abgetrennt werden (72,95). Bei der Durchführung des Testes entsprechend dem Schema in Abb.17a hätten Rheumafaktoren den Test nicht stören können. Die für diese Testmodifikation notwendige Markierung von Mikrogrammengen Neuraminidase mit einem Markerenzym erwies sich jedoch als nicht praktikabel, so daß nur noch die in Abb.17b schematisch aufgezeigte Variante eines Immunoassays zur Bestimmung von Anti-NA-Antikörpern sinnvoll und durchführbar schien. Ein großer Vorteil dieser Variante ist, daß zu ihrer Durchführung keine großen Mengen eines sehr empfindlichen Antigens isoliert werden müssen. Auch bei neu auftretenden durch Drift oder Shift veränderten Antigenen steht der Test einige Tage nach Isolierung geringer Mengen Antigen zur Verfügung.

Abb. 17:

Schema möglicher nicht-kompetitiver Enzymimmunoassays zum Nachweis von Anti-NA-Antikörpern

Abb.17a:

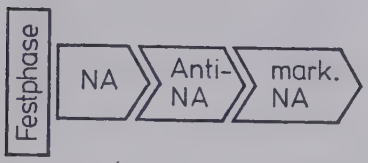
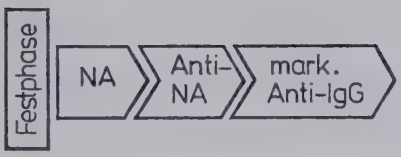


Abb.17b:



NA	= Neuraminidase
Anti-NA	= Anti-NA-Antikörper enthaltendes Serum
mark. NA	= enzymmarkierte Neuraminidase
mark. anti-IgG	= markiertes Anti-IgG

Bei der Anwendung des enzymgebundenen Immunoassays gelang es während einer Impfaktion mit einer Influenza-Spaltvaccine das Impfergebnis über Titeranstiege zu verfolgen. Die Ergebnisse stimmten in qualitativer Hinsicht mit denen des Hemmtestes überein. In quantitativer Hinsicht ergaben sich jedoch bei den Einzelergebnissen der beiden Teste erhebliche Differenzen.

WATANABE (110,111) und SIX (97) fanden bei enzym- bzw. radioimmunologischen Bestimmungen von Antikörpern gegen Hämagglutinin eine schlechte Korrelation der einzelnen Ergebnisse aus ELISA einerseits und Neuraminidase-Hemmtest und Hämagglutinations-Hemmtest andererseits. Diese schlechte Übereinstimmung der einzelnen Meßergebnisse sagt nach WATANABE nichts über die Qualität des Testes aus. ELISA und RIA messen die totale Bindungskapazität eines Antigens gegenüber einem Antiserum. Dabei können Antikörper bestimmt werden, die bei der Bindung an das Antigen nicht zu einer Verringerung der enzymatischen Aktivität führen und deswegen mit Hilfe des NA-Hemmtestes nicht erfaßt werden. Es ist auch leicht vorstellbar, daß Anti-NA--Antikörper in Abhängigkeit von ihrem Bindungsort die Enzymaktivität der Neuraminidase in unterschiedlichem

Ausmaß hemmen. Die verschiedenen Seren neigen in unterschiedlichem Maße zur unspezifischen Adsorption an die Plattenwand und an die Proteinschichten auf der Festphase, so daß im Einzelfall enzymimmunologisch nicht entschieden werden kann, ob ein Serum spezifische Antikörper in niedrigen Titern enthält oder ob der fragliche Titer nur die Folge unspezifischer Adsorption von Serumglobulinen ist. Der Nachweis von Anti-NA--Antikörpern in niedrigen Titern erfolgt deswegen zuverlässiger mit dem Enzymhemmtest. Zur Untersuchung eines Titeranstieges während einer fraglichen Influenzaerkrankung oder nach Impfungen ist der ELISA dem Hemmtest wegen seiner einfacheren Durchführbarkeit überlegen. Zum selektivem Nachweis von Antikörpern der IgM- oder IgG-Klasse ohne größeren apparativen Aufwand ist der enzymgebundene Immunoassay eine geeignete Methode. In der vorliegenden Arbeit wurden selektiv Antikörper der Klasse G nachgewiesen; IgM-Antikörper entgehen dem Nachweis in diesem Testsystem und können durch Blockade der Ag-Bindungsstellen an der Plattenwand ein falsch negatives Ergebnis verursachen (45). Nicht unproblematisch ist, daß zur Isolierung des Antigens Proteasen eingesetzt wurden, gegen die das Antigen sehr empfindlich ist. Die enzymatische Abtrennung antigener Determinanten könnte leicht zu falsch negativen

Ergebnissen führen. Eine enzymatische Abtrennung der Oberflächenantigene ist jedoch im Hinblick auf die allgemeine Anwendbarkeit des Testes unbedingt erforderlich.

Trotz der aufgezeigten Problematik bietet der enzymgebundenen Immunoassay viele Vorteile gegenüber etablierten Testmethoden zum Nachweis von Anti-NA--Antikörpern. Mit dem ELISA können in kurzer Zeit große Serumkollektive mit geringem apparativen Aufwand durchgetestet werden.

Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit des zweiten Oberflächenantigens Neuraminidase (N) des Influenzavirus gegenüber Proteasen (Bromelin, Nagarse, Pronase) wird an drei verschiedenen Antigenen untersucht. Mit Pronase gelingt, auch im Falle einer gegenüber Proteasen empfindlichen Neuraminidase, die Abtrennung des Antigens von den inneren Antigenen des Virus ohne Zerstörung der Lipidmembran. Es wurde versucht isolierte Neuraminidase und Meerrettichperoxydase mit Glutaraldehyd zu verkoppeln. Das entstehende Kopplungsprodukt zeigte jedoch nur eine geringe enzymatische Aktivität, so daß sein Einsatz in einem kompetitiven Enzymimmunoassay nicht möglich war.
Mit der enzymatisch von den inneren Antigenen des Virus abgetrennten Neuraminidase werden in einem nicht-kompetitiven Immunoassay Anti-N-Antikörper nachgewiesen. Experimentell werden Möglichkeiten zur Vermeidung eines falsch positiven Antikörpernachweises durch unspezifische Immunglobulinadsorption an die Festphase aufgezeigt.
Bei der Anwendung des enzymgebundenen Immunoassays (ELISA) gelingt es während einer Impfaktion mit einer Influenza-Spaltvaccine das Impfergebnis über Titeranstiege zu verfolgen. Die Ergebnisse stimmen in qualitativer Hinsicht mit denen des Neuraminidasehemmtestes überein. In quantitativer Hinsicht ergeben sich bei den Einzelergebnissen der beiden Teste teilweise erhebliche Differenzen. Ursachen für diese Differenzen werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

(1) Aminoff D.
Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.
Biochem. J. 1961; 81: 384-392

(2) Avrameas S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde.
Immunochemistry 1969; 6: 43-52

(3) Avrameas S., Ternynck T.
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents.
Immunochemistry 1969; 6: 53-66

(4) Aymard-Henry M., Coleman M.T., Dowdle W.R., Schild G.C., Webster R.G.
Influenza virus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures.
Bull. WHO 1973; 48: 199-202

(5) Bachmayer H.
Selective solubilization of hemagglutinin and neuraminidase from influenza viruses.
Intervirology 1975; 5: 260-272

(6) Bachmayer H., Liehl E., Schmidt G.
Preparation and properties of a novel influenza subunit vaccine.
Postgrad. Med. J. 1976; 52: 360-367

(7) Bachmayer H., Schmidt G.
Selective removal of neuraminidase from influenza A2 viruses.
Med. Microbiol. Immunol. 1972; 158: 91-94

(8) Bachmayer H., Wagner K.
Characterization of recent influenza A variants.
Arch. Gesamte Virusforsch. 1973; 42: 177-181

(9) Barbour H.M.
Development of an enzyme immunoassay for human placental lactogen using labelled antibodies.
J. Immunol. Methods 1976; 11: 15-23

(10) Becht H., Hämmerling K., Rott R.
Undisturbed release of influenza virus in the presence of univalent antibodies.
Virology 1971; 46: 337-343

(11) Belanger L., Hamel D., Dufour D., Pouliot M.
Double-antibody enzyme immunoassay applied to human alpha-1-fetoprotein.
Clin. Chem. 1976; 22: 198-204

(12) Berg R.A., Rennard S.J., Murphy B.R.,
Yolken R.H., Dolin R., Straus S.E.
New enzyme immunoassays for measurement of influenza
A/Victoria/3/75 virus in nasal washes.
Lancet 1 1980: 851-853

(13) Bergmeyer H.U. (Ed.)
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim Bergstr. 1970

(14) Blaskovic D., Styk B.
Laboratory Methods of virus transmission in
multicellular organisms.
In: Maramorosch K., Koprowski H. (Eds.)
Methods in Virology 163-235
Academic Press New York & London 1967

(15) Bradford M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation
of microgram quantities of protein utilizing the
principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254

(16) Brand C.M., Skehel J.J.
Crystalline antigen from the influenza virus envelope.
Nature (New Biol.) 1972; 238: 145-147

(17) Bucher D.J.
Purification of neuraminidase from influenza viruses by affinity chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 1977; 482: 393-399

(18) Carlsson H.E., Lindberg A.A.
Application of enzyme immunoassay for diagnosis of bacterial and mycotic infections.
Scand. J. Immunol. 1978; 8, Suppl. 7: 97-110

(19) Coleman M.T., Dowdle W.R., Pereira H.G., Schild G.C., Chang W.K.
The Hong Kong 68 influenza A2 variant.
Lancet 2 1968: 1384-1386

(20) Collins J.K., Knight C.A.
Purification of the influenza hemagglutinin glycoprotein and characterization of its carbohydrate components.
J. Virol. 1978; 26: 457-467

(21) Compans R.W., Dimmock N.J., Meier-Ewert H.
Effect of antibody to neuraminidase on the maturation and hemagglutinating activity of an influenza A2 virus.
J. Virol. 1969; 4: 528-534

(22) Compans R.W., Klenk H.D., Caliguiri L.A., Choppin P.W.
Influenza virus proteins.
Virology 1970; 42: 880-889

(23) Couch R.B., Kasel J. A., Gerin J.L., Schulman J.C., Kilbourne E.D.
Induction of partial immunity to influenza by a neuraminidase-specific vaccine.
J.Infect. Dis. 1974; 129: 411-420

(24) Ginsberg H.S.
in: Davis B.D., Dulbecco R.,Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B. (Eds.)
Microbiology
Harper & Row New York 1980; 1120-1138

(25) Desselberger U.
Preparation-conditioned changes of the antigenicity of influenza virus neuraminidases.
Arch. Virol. 1977; 53: 335-349

(26) Dinesen B., Saxtrup Nielsen O.
A sensitive enzyme-immunoassay for the quantitation of human IgM.
Scan. J. Clin.Lab. Invest. 1979; 39: 449-454

(27) Drzeniek R.
Viral and bacterial neuraminidases.
in: Arber W., Haas R., Henle W. et.al. (Eds.)
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1972; 59: 35-74

(28) Drzeniek R., Frank H., Rott R.
Electron microscopy of purified influenza neuraminidase.
Virology 1968; 36: 703-707

(29) Drzeniek R., Seto J.T., Rott R.
Characterization of neuraminidases from myxoviruses.
Biochim. Biophys. Acta 1966; 128: 547-558

(30) EMBO Laboratory course on B-lymphocyte fusion.
Basel Institute for Immunology 1978

(31) Engvall E.
Enzyme immunoassay ELISA and EMIT.
in: Van Vunakis H., Langone J.J. (Eds.)
Methods Enzymol. 70: 419-439
Academic Press New York & London 1980

(32) Engvall E., Jonsson K., Perlman P.
Enzyme-linked immunosorbent assay.
II. Quantitative assay of protein antigen,
immunoglobulin G, by means of enzyme-linked
antigen and antibody-coated tubes.
Biochim. Biophys. Acta 1971; 251: 419-426

(33) Engvall E., Jonsson K., Perlmann P.
Enzyme-linked immunosorbent assay.
II. Quantitative assay of protein antigen,
immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled
antigen and antibody-coated tubes.
Biochim. Biophys. Acta 1971; 251: 427-434

(34) Engvall E., Perlman P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 1971; 8: 874-879

(35) Ford D.J., Radin R., Pesce A.J.
Characterization of glutaraldehyde coupled alkaline phosphatase-antibody and lactoperoxidase-antibody conjugates.
Immunochemistry 1978; 15: 237-243

(36) Frankel M.E., Gerhard W.
The rapid determination of binding constants for antiviral antibodies by a radioimmunoassay.
An analysis of the interaction between hybridoma proteins and influenza virus.
Immunochemistry 1979; 16: 101-106

(37) Gosslau B., Barrach H.-J.
Enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of specific antibodies to collagen type I.
J. Immunol. Methods 1979; 29: 71-77

(38) Gottschalk A., Bhargava A.S.
Neuraminidases
in: Boyer P.D. (Ed.)
The Enzymes Vol.V: 321-341
Academic Press New York und London 1971

(39) Gregoriades A.
Isolation of neuraminidases from the WSN strain of influenza virus.
Virology 1972; 49: 333-336

(40) Groome N.P., Belyavin G., Lansdell A., Ashford D.
Structure and composition of the N2 neuraminidase of influenza virus.
Effect of carbohydrate content on the validity of molecular weight estimations.
Biochim. Biophys. Acta 1977; 495: 58-70

(41) Habeeb A.F.S.A., Hiramoto R.
Reaction of proteins with glutaraldehyde.
Arch. Biochem. Biophys. 1968; 126: 16-26

(42) Hamaguchi Y., Kato K., Fukui H., Shirakawa I., Okawa S., Ishikawa E., Kobayashi K., Katunuma N.
Enzyme-linked sandwich immunoassay of macromolecular antigens using the rabbit antibody-coupled glass rod as a solid phase.
Eur. J. Biochem. 1976; 71: 459-467

(43) Haslam E.A., Hampson A.W., Radiskevics J., White D.O.
The polypeptides of influenza virus.
III. Identification of the hemagglutinin, neuraminidase and nucleocapsid proteins.
Virology 1970; 42: 566-575

(44) Hirst G.K.
Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.
Science 1941; 94: 22-23

(45) Holmgren J., Svennerholm A.M.
Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology.
Infect. Immun. 1973; 7: 759-763

(46) Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.
Medizinische Mikrobiologie 4.Auflage S. 568-583
Springer Heidelberg & Berlin 1977

(47) Kaplan M.M., Webster R.G.
The epidemiology of influenza.
Sci. Am. 1977; 237: 88-106

(48) Kendal A. P., Biddle F., Belyavin G.
Influenza virus neuraminidase and the viral surface.
Biochim. Biophys. Acta 1968; 165: 419-431

(49) Kendal A.P., Bozeman F.M., Ennis F.A.
Further studies of the neuraminidase content of inactivated influenza vaccines and the neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations.
Infect. Immun. 1980; 29: 966-971

(50) Kendal A.P., Eckert E.A.
The preparation and properties of 14C-carboxamido-
-methylated subunits from A2/1957 influenza
neuraminidase.
Biochim. Biophys. Acta 1972; 258: 484-495

(51) Kennedy J.H., Kricka L.J., Wilding P.
Protein-protein coupling reactions and the applications
of protein conjugates.
Clin. Chim. Acta 1976; 70: 1-31

(52) Kilbourne E.D., Choppin P.W., Schulze J.T.,
Scholtissek C., Bucher D.L.
Influenza virus polypeptides and antigens - summary
of influenza workshop I.
J. Infect. Dis. 1972; 125: 447-455

(53) Kilbourne E.R.
in: Beeson P.B., Mc Dermott W., Wyngaarden J.B. (Eds.)
Textbook of Medicine S. 240-246
W.B. Saunders Company
Philadelphia London Toronto 1979

(54) Kilbourne E.D., Schulman J.L., Couch R.B.,
Kasel J.A. in:
Melnick J.L. (Ed.)
International Virology 2, S.118-199
(Proceedings of the second international congress
for virology, Budapest 1971)
Karger Basel

(55) Klenk H.D., Rott R., Becht H.
On the structure of the influenza virus envelope.
Virology 1972; 47: 579-591

(56) Kuwert E., Werner J., Franke G., Paulus W.
Untersuchungen zur Antikörperbildung gegen Hämagglutinin und Neuraminidase durch eine Subunit-Vakzine gegen Influenza.
Zentral. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 1979; 244: 1-16

(57) Landsberger F.R., Compans R.W., Choppin P.W., Lenard J.
Organization of the lipid phase in viral membranes. Effects of independent variation of the lipid and the protein composition.
Biochemistry 1973; 22: 4498-4502

(58) Landsberger F.R., Lenard J., Paxton J., Compans R.W.
Spin-label electron spin resonance study of the lipid-containing membrane of influenza virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1971; 68: 2579-2583

(59) Laver W.G.
The polypeptides of influenza viruses.
Adv. Virus Res. 1973; 18: 57-103

(60) Laver W.G.
Purification of influenza virus.
In: Habel K., Salzman N.P.
Fundamental Techniques in Virology S.82-86
Academic Press New York & London 1969

(61) Laver W.G.
Crystallization and peptide maps of neuraminidase "heads" from H2N2 and H3N2 influenza virus strains.
Virology 1978; 86: 78-87

(62) Laver W.G.
Structural studies on the protein subunits from three strains of influenza virus.
J. Mol. Biol. 1964; 9: 109-124

(63) Laver W.G.
The structure of influenza viruses.
3. Disruption of the virus particle and separation of neuraminidase activity.
Virology 1963; 20: 251-262

(64) Laver W.G., Kilbourne E.D.
Identification in a recombinant influenza virus of structural proteins derived from both parents.
Virology 1966; 30: 493-501

(65) Laver W.G., Valentine R.C.
Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus.
Virology 1969; 38: 105-119

(66) Laver W.G., Webster R.G.
Selection of antigenic mutants of influenza viruses.
Isolation and peptide mapping of their hemagglutinating proteins.
Virology 1968; 34: 193-202

(67) Lazdins J., Haslam E.A., White D.O.
The polypeptides of influenza virus.
VI. Composition of the neuraminidase.
Virology 1972; 49: 758-765

(68) Lehtonen O.P., Viljanen M.K.
Antigen attachment in ELISA.
J. Immunol. Methods 1980; 34: 61-70

(69) Lenard J., Compans R.W.
The membrane structure of lipid-containing viruses.
Biochim. Biophys. Acta 1974; 344: 51-94

(70) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.,Randall R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275

(71) Maiolini R., Ferrua B., Masseyeff R.
Enzymeimmunoassay of human alpha-fetoprotein.
J. Immunol. Methods 1975; 6: 355-362

(72) Maiolini R., Masseyeff R.
A sandwich method of enzymeimmunoassay.
I. Aplication to rat and human alpha-fetoprotein.
J. Immunol. Methods 1975; 8: 223-234

(73) Miyai K., Ishibashi K., Kumahara Y.
Enzyme-linked immuonassay of thyrotropin.
Clin. Chim. Acta 1976; 67: 263-268

(74) Mok-Hsu
Inaugural Dissertation
Tübingen 1983

(75) Murphy B.R., Kasel J.A., Chanock R.M.
Association of serum anti-neuraminidase antibody.
with resistance to influenza in man.
N. Engl. J. Med. 1972; 286: 1329-1332

(76) Nakane P. K., Kawaoi A.
Peroxidase-labeled antibody - a new method of conjugation.
J. Histochem. Cytochem. 1974; 22: 1084-1091

(77) Narahashi Y.
Pronase
in: Perlman G.E., Lorand L. (Eds.)
Methods in enzymology XIX
Proteolytic enzymes S. 651-664
Academic Press New York & London 1970

(78) Ottesen M., Svendsen J.
The Subtilisins
in: Perlmann G.E., Lorand L. (Eds.)
Methods in enzymology XIX
Proteolytic enzymes S.199-215
Academic Press New York und London 1970

(79) Palese P., Bucher D., Kilbourne E.D.
Applications of a synthetic neuraminidase substrate.
Appl. Microbiol. 1973; 25: 195-201

(80) Paerels G.B., Schut J.
The mechanism of the periodate-thiobarbituric acid reaction of sialic acids.
Biochem. J. 1965; 96: 787-792

(81) Potter C.W., Path M.R.C., Oxford J.S.
Determinants of immunity to influenza infection in man.
Br. Med. Bull. 1979; 35: 69-75

(82) Raith L.
Einführung in radioimmunologische Methoden.
Byk-Mallinkrodt Radiopharmazeutika-Diagnostica
Dietzenbach-Steinberg 1975

(83) Richards F.M., Knowles J.R.
Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent.
J. Mol. Biol. 1968; 37: 231-233

(84) Rosenthal J.D., Hayshi K., Notkins A.C.
Comparison of direct and indirect solid-phase microradioimmunoassays for the detection of viral antigens and antiviral antibody.
Appl. Microbiol. 1973; 25: 567-573

(85) Russ G., Styk B., Polakova K., Vareckova E.
A competitive-inhibition radioimmunoassay for influenza virus envelope antigens.
Acta Virol. 1976; 20: 460-465

(86) Sachs D.H., Winn H.J.
The use of glutaraldehyde as a coupling agent for ribonuclease and bovine serum albumin.
Immunochemistry 1970; 7: 581-585

(87) Salonen E.-M., Vaheri A.
Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of immunoglobulins on polystyrene surface for immunoassays.
J. Immunol. Methods 1979; 30: 209-218

(88) Santer U.V., Yee-Foon J., Glick M.C.
A rapid assay for neuraminidase. The detection of two differences in activity associated with virus transformation.
Biochim. Biophys. Acta 1978; 523: 435-442

(89) Scharpé S.L., Cooreman W.M., Blomme W.J., Laekeman G.M.
Quantitative enzyme immunoassay: current status.
Clin. Chem. 1976; 22: 733-738

(90) Scherrer R., Bernard S.
Application d'une technique immunoenzymologique (ELISA) à la detection du rotavirus BOVIN et des anticorps dirigeés contre lui.
Ann. Microbiol. 1977; 128A: 499-510

(91) Lennette E.H., Schmidt N.J. (Eds.)
Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections
American Public Health Association 1979

(92) Scholtissek C.
The genes coding for the surface glycoproteins of influenza A virus contain a small conserved and a large variable region.
Virology 1979; 93: 594-597

(93) Schulman J.L., Khakpour M., Kilbourne E.D.
Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice.
J. Virol. 1968; 2: 778-786

(94) Schulze I.T.
The structure of influenza virus.
II.A model based on the morphology and composition of subviral particles.
Virology 1972; 47: 181-196

(95) Schuurs A.H.W.M., Van Weemen B.K.
Enzyme-immunoassay.
Clin. Chim. Acta 1977; 81: 1-40

(96) Setó J.T., Drzeniek R., Rott R.
Isolation of a low molecular weight sialidase (neuraminidase) from influenza virus.
Biochim. Biophys. Acta 1966; 113: 402-404

(97) Six H.R., Kasel J.A.
Radioimmunoprecipitin assay for quantitation of serum antibody to the hemagglutinin of type A influenza virus.
J. Clin. Microbiol. 1978; 7: 165-171

(98) Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P.
A virus obtained from influenza patients
Lancet 2: 66-68,1933

(99) Stanley P., Crook N.E.
The polypeptides of influenza virus.
VIII. Large-scale purification of the hemagglutinin.
Virology 1973; 56: 640-645

(100) Stuart-Harris C.H.
Epidemiology of influenza in man.
Br. Med. Bull. 1979; 35: 3-8

(101) Stuart-Harris C.H., Schild G.C.
Influenza - The viruses and the disease.
Arnold London 1976

(102) Takashi Murachi
Bromelin enzymes
in: Perlman G.E., Lorand L. (Eds.)
Methods in enzymology XIX
Proteolytic enzymes 273-284
Academic Press New York & London 1970

(103) Tyrrel D.A.J., Smith J.W.G.
Vaccination against influenza A .
Br. Med. Bull. 1979; 35: 77-85

(104) Ullman E.F., Blakemore J., Leute R.K.,
Eimstad W., Jaklitsch A.
Homogenous enzyme immunoassay for thyroxine.
Clin. Chem. 1975; 21: 1011

(105) Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.
Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Lett. 1971; 15: 232-236

(106) Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.
Immunoassay using hapten-enzyme conjugates.
FEBS Lett. 1972; 24: 77-81

(107) Voller A., Bartlett A., Bidwell D.E.
Clark M.F., Adams A.N.
The detection of viruses by enzyme-linked
immunosorbent assay (ELISA).
J. Gen. Virol. 1976; 33: 165-167

(108) Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A.
Enzyme immunoassays in diagnostic medicine-
theory and practice.
Bull. WHO 1976; 53: 55-63

(109) Warren L.
The thiobarbituric acid assay of sialic acids.
J. Biol. Chem. 1959; 334: 1971-1975

(110) Watanabe H., Pollet M.A., Mackenzie J.S.
The use of enzyme-linked immunosorbent assay to
determine the appearance, specifity and immunoglobulin
class of antibodies to the structural proteins
of influenza A virus in mice.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1980; 58: 189-199

(111) Watanabe H., Pollet M., Mackenzie J.S.
Purification of antibodies to influenza A virus structural proteins by affinity chromatography and their participation in hemagglutination-inhibition, neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay.
Aust.J. Exp. Biol. Med. Sci. 1979; 57: 303-312

(112) Webster R.G., Darlington R.W.
Disruption of myxoviruses with Tween 20 and isolation of biologically active hemagglutinin and neuraminidase subunits.
J. Virol. 1969; 4: 182-187

(113) White D.O.
Influenza virus proteins: Identification and sythesis.
In: Arber W., Haas R., Henle W. et al. (Eds.)
Curr. Top.Microbiol. Immunol. 1974; 63: 1-48

(114) Wisdom E.B.
Enzyme immunoassay.
Clin. Chem. 1976; 22: 1243-1255

(115) Wright C.E., Laver W.G.
Preliminary crystallographic data for influenza virus neuraminidase "heads".
J. Mol. Biol. 1978; 120: 133-136

(116) Wrigley N.G., Skehel J.J., Charlwood P.A.
Brand C.M.
The size and shape of influenza virus neuraminidase.
Virology 1973; 51: 525-529

(117) Yalow R., Berson S.
Assay of plasma insulin in human subjects by
immunological methods.
Nature 1959; 184 (Suppl.21): 1648-1649

(118) Yamane N., Odagiri T., Arikawa J.,
Kumasaba M., Ishida N.
Effect of specific immunity to viral neuraminidase
on subsequent influenza virus infection in man.
Microbiol. Immunol. 1979; 23: 565-567

(119) Yolken R.H., Wyatt R.G., Kim H.W.,
Kapikian A.Z., Chanock R.M.
Immunological response to infection with human
reovirus-like agent: measurement of anti-human
reovirus-like agent immunoglobulin G and M
levels by the method of enzyme-linked immunosorbent
assay.
Infect. Immun. 1978; 19: 540-546

(120) Zollinger W.D., Darlrymple J.M., Artenstein M.S.
Analysis of parameters affecting the solid phase
radioimmunoassay quantitation of antibody to
meningococcal antigens.
J. Immunol. 1976; 117: 1787-1798

LEBENSLAUF

Am 30. November 1952 wurde ich in Stuttgart als Sohn des Architekten Nollet Schubert und seiner Ehefrau Isolde geb. Welsch geboren. Von 1959—1964 besuchte ich die Volksschule in Grötzingen/Krs. Esslingen. 1964 trat ich in das Max-Planck-Gymnasium in Nürtingen ein, wo ich im Juni 1973 das Abitur ablegte. Meinen zivilen Ersatzdienst leistete ich von Dezember 1973 bis März 1975 am Paracelsus-Krankenhaus in Ostfildern-Ruit ab.

Im Sommersemester 1975 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Biochemie. Ab April 1977 studierte ich zunächst in Ulm Humanmedizin, wo ich im März 1978 die ärztliche Vorprüfung ablegte und anschließend an die Universität Tübingen wechselte. Im Herbst 1978 bestand ich den letzten Teil des Vordiploms in Biochemie und beendete damit mein Biochemiestudium. Im August 1979 legte ich den 1. Abschnitt und im März 1981 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Praktischen Jahr war ich von April 1981 bis März 1982 am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart. Den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 27. April 1982 in Stuttgart. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 29. April 1982.